

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET COMPARATIF DES ANTHOCYANIDINES SUR L'ACTION
PROANGIOGÉNIQUE DE LA PÉRIOSTINE DANS L'ENDOTHÉLIUM
VASCULAIRE CÉRÉBRAL

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

PASCALE GAGNÉ

AOÛT 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Dr Borhane Annabi de m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise au sein de son équipe sur un sujet qui me tient à cœur. Un merci pour toutes les connaissances et techniques que j'ai pu acquérir grâce à son accueil dans son laboratoire. Ses encouragements et son enthousiasme pour la recherche ont contribué à alimenter ma passion scientifique.

Je remercie le Dr Richard Béliveau pour sa grande contribution dans l'avancement de la recherche et la sensibilisation qu'il apporte aux gens sur la prévention du cancer. Un merci pour l'immense privilège que j'ai eu de participer à ce projet.

Je remercie spécialement le Dre Sylvie Lamy pour son soutien, ses encouragements, sa disponibilité et son encadrement qui m'ont été chers tout au long de mon cheminement académique. Un grand merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir aidé à développer continuellement mon esprit scientifique.

Merci aux techniciens Julie Poirier, Annie Levert et Alain Zgheib pour leur aide et leurs précieux conseils de différentes techniques ainsi que pour leur contribution dans la réalisation de manipulations.

Merci spécialement à Amira Ouanouki pour sa disponibilité et sa précieuse aide ainsi qu'à toute l'équipe du Laboratoire d'Oncologie Moléculaire et de la Chaire en prévention et traitement du cancer pour l'aide et les conseils apportés. Notamment : Dre Chirine Toufaily, Dre Khadidja Haidara, Dre Cyndia Charfi, Dr David Beauchemin, Jonathan Pratt, Amélie Vézina, Ikram Hana Benenemissi, Aroua Ben Saad, Samuel Sheehy, Bayader Annabi, Djahida Djerir, Samuel Burke-Nanni,

Clémence Bensiali-Hadaud, Evelyne Muhire, Julie Poirier, Alain Zgheib et Annie Levert. Ce fut un honneur de faire partie de cette belle équipe.

Merci au soutien financier de la Chaire en prévention et traitement du cancer et de la Fondation de l'UQÀM.

DÉDICACES

À ma sœur Mylène

Ma meilleure amie, qui est une source de motivation pour moi et sur qui je peux toujours compter, même si nous sommes loin l'une de l'autre.

À mes parents Bertin et Sonia

Qui m'ont permis de devenir qui je suis. Qui ont cru en moi et m'ont toujours encouragé de poursuivre mes études. Et qui m'ont appuyé dans toutes les épreuves de ma vie.

À mon fiancé Julien

Qui m'a supporté dans mes moments difficiles et qui a su me donner l'énergie, l'amour et le courage nécessaire tout au long de ma maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABREVIATIONS.....	x
RÉSUMÉ.....	xii

CHAPITRE I

INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer	1
1.1.1 Statistiques	1
1.1.2 La cancérogenèse	2
1.2 L'angiogenèse	4
1.2.1 L'angiogenèse physiologique vs pathologique	4
1.2.2 Les cellules de l'endothélium vasculaire	6
1.2.2.1 Généralités.....	6
1.2.2.2 La barrière hémocéphalique	6
1.2.2.3 Phénotype et morphologie.....	7
1.2.3 Les étapes de l'angiogenèse tumorale.....	9
1.2.4 Facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire	11
1.2.5 Hypoxie	12
1.3 La migration cellulaire	15
1.3.1 Les principales étapes	15
1.3.1.1 La voie d'ERK	17
1.3.1.2 La voie de p38.....	18
1.3.1.3 La voie de JNK.....	18
1.3.1.4 La voie de PI3K	19
1.4 Invasion tumorale et métastase	20
1.5 La périostine.....	21
1.5.1 Structure génique et protéique	21
1.5.2 Rôle dans les tissus sains.....	24
1.5.3 Expression et fonction dans le cancer	25
1.5.4 Les intégrines; récepteurs de la périostine	27
1.5.5 Voies de signalisation intracellulaire de la périostine.....	28
1.6 Nutrition et cancer.....	30
1.6.1 Les aliments et la prévention du cancer	30
1.6.2 Les phytochimiques	31

1.6.3 Les anthocyanidines.....	33
1.6.3.1 Structure chimique	33
1.6.3.2 Effets bénéfiques.....	35
CHAPITRE II	
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS.....	37
2.1 Problématique	37
2.2 Hypothèse de travail.....	37
2.3 Objectifs de recherche.....	38
CHAPITRE III	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	39
3.1 Matériels.....	39
3.2 Méthodes	40
3.2.1 Culture cellulaire.....	40
3.2.2 Traitement, récolte et lyse cellulaire	41
3.2.3 Dosage des protéines selon la méthode microBCA	41
3.2.4 Analyse par immunobuvardage.....	42
3.2.5 Extraction d'ARN, synthèse d'ADNc et PCR en temps réel	43
3.2.6 Analyse de cytotoxicité par cytométrie en flux.....	44
3.2.7 Migration cellulaire avec le système d'analyse xCELLigence	44
3.2.8 Méthode de transfection pour les petits ARN interférents.....	45
3.2.9 Analyses statistiques	46
CHAPITRE IV	
RÉSULTATS	47
4.1 Expression et sécrétion de la périostine dans trois modèles cellulaires endothéliaux; HBMEC, HMVEC et HUVEC	47
4.2 Effet des anthocyanidines sur l'expression et la sécrétion de la périostine dans les HBMEC	50
4.3 Effet des anthocyanidines sur l'expression et la sécrétion de la périostine en fonction de la concentration	52
4.4 Effet des anthocyanidines sur la viabilité cellulaire des HBMEC	59
4.5 Effet des anthocyanidines sur l'expression génique des intégrines	60
4.6 La périostine induit la migration des HBMEC	63
4.7 Impact des intégrines sur la migration induite par la périostine recombinante	65

4.8 Effet des anthocyanidines sur la phosphorylation de ERK1/2 induite par la périostine recombinante	67
CHAPITRE V	
DISCUSSION	70
5.1 Expression et sécrétion de la périostine dans trois lignées cellulaires endothéliales	71
5.2 Inhibition de l'expression et de la sécrétion de la périostine par les anthocyanidines	72
5.2.1 Mécanismes d'action des anthocyanidines	73
5.2.2 Signification physiologique des valeurs IC ₅₀ obtenues	75
5.3 Inhibition du niveau d'expression génique des intégrines par les anthocyanidines	76
5.4 Migration cellulaire induite par la périostine recombinante humaine	76
5.5 Signalisation cellulaire induite par la périostine recombinante humaine	79
CHAPITRE VI	
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	80
6.1 Conclusion	80
6.2 Perspectives	81
BIBLIOGRAPHIE	83

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Caractéristiques du cancer	3
1.2 Angiogenèse physiologique vs pathologique	5
1.3 Caractéristiques morphologiques des cellules endothéliales normales du cerveau et dérivées de tumeurs cérébrales	8
1.4 Étapes de l'angiogenèse.....	10
1.5 Régulation génique et protéique sous condition de normoxie vs hypoxie.....	13
1.6 Exemples de migration cellulaire collective	16
1.7 Rôle de la périostine dans le cancer.....	23
1.8 Structure chimique des principales anthocyanidines	34
4.1 Niveaux d'expression protéique et de sécrétion de la périostine dans les lignées cellulaires endothéliales humaines HBMEC, HMVEC et HUVEC.....	49
4.2 Inhibition par les anthocyanidines de l'expression protéique de la périostine au niveau basal dans les HBMECs	51
4.3 Les anthocyanidines inhibent l'expression et la sécrétion protéique de la périostine basale dans les HBMECs	53
4.4 Effet des anthocyanidines sur la viabilité des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales	61
4.5 Les intégrines α_v , α_5 , α_6 , β_1 , β_3 et β_5 sont exprimées dans les HBMEC et affectées par les anthocyanidines.....	62
4.6 Inhibition de la migration induite par la périostine par les anthocyanidines dans les HBMECs.....	64
4.7 Impact des intégrines sur la migration cellulaire des HBMECs induite par la périostine recombinante.....	66
4.8 Inhibition par les anthocyanidines de l'induction de la phosphorylation de ERK1/2 dans les HBMECs	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Principales sources alimentaires des différentes familles de composées phytochimiques aux propriétés anticancéreuses	32
4.1 Valeur des IC ₅₀ des anthocyanidines sur l'expression protéique de la périostine dans les lysats des HBMEC	58

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AKT	Protéine kinase B
AP-1	protéine activatrice 1
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière hémocéphalique
Cy	Cyanidine
Dp	Delphinidine
EMI	Emilin-like
ERK	Kinase régulée par des signaux extracellulaire
FAK	Kinase d'adhésion focale
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
Flk-1/KDR	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire - 2
GLUT1	Transporteur de glucose de type 1
HBMECs	Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines
HIF-1 α	Facteur induit par l'hypoxie alpha
HIF-1 β	Facteur induit par l'hypoxie beta
HMVEC	Cellules endothéliales microvasculaires humaines du derme
HUVEC	Cellules endothéliales humaines de la veine du cordon ombilical
IL	Interleukine
JNK	c-Jun N-terminale kinase
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
MEC	Matrice extracellulaire
MMPs	Métalloprotéinases de la matrice extracellulaire
Mv	Malvidine
NF-KB	Facteur nucléaire kappa B
OSF-2	Facteur spécifique des ostéoblastes 2
OMS	Organisation mondiale de la santé
OXPHOS	Phosphorylation oxydative mitochondriale
Pg	Pélagonidine
PI3K	Phosphoinositide 3 - kinase
Po	Péonidine
POSTN	Périostine, facteur spécifique des ostéoblastes 2
Pt	Pétunidine
ROS	Espèces réactives d'oxygène
SAPK	Protéines kinases activées par le stress
SLC2A1	Transporteur de glucose de type 1

TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF- β	Facteur de croissance transformant – beta
U-87	Cellules humaines de glioblastome
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
WCRF	World cancer research foundation

RÉSUMÉ

La progression tumorale, impliquant l'angiogenèse et la métastase, est médiée par plusieurs protéines dont la périostine, une protéine de la matrice extracellulaire. Celle-ci, surexprimée dans plusieurs types de cancers, a été démontrée essentielle dans l'établissement des métastases. Un grand nombre d'études épidémiologiques affirment qu'une consommation riche en fruits et légumes diminue significativement le risque de développer plusieurs maladies chroniques en particulier le cancer. Ces résultats indiquent un rôle important de la chimiothérapie préventive par les molécules d'origine alimentaire. L'impact des anthocyanidines contenues dans les petits fruits sur l'action proangiogénique de la périostine demeure cependant inconnu.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer les effets des principales anthocyanidines des petits fruits telles que la delphinidine, la pélagonidine, la pétunidine, la cyanidine et la malvidine sur l'action proangiogénique de la périostine. Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (HBMEC) ont été cultivées *in vitro* en conditions normoxique (20% d'O₂) ou hypoxique (<2% d'O₂) afin de reproduire les tensions faibles d'oxygène caractérisant le centre des tumeurs solides.

Les résultats de notre recherche démontrent que les anthocyanidines inhibent l'expression protéique et la sécrétion de la périostine. Ces effets inhibiteurs ne sont pas dus à une toxicité cellulaire. Les intégrines α_5 , α_6 , β_1 , β_3 et β_5 ont été identifiées comme récepteurs potentiels de la périostine dans les HBMEC et leur expression génique est inhibée par les anthocyanidines. Celles-ci affectent aussi la migration des HBMEC induite par la périostine et cet effet inhibiteur serait attribuable à l'inhibition de l'expression de ces intégrines ainsi que de la phosphorylation de ERK1/2. Dans l'ensemble, les résultats obtenus dans la condition de normoxie ont été reproduits dans la condition d'hypoxie, renforçant les propriétés anticancéreuses des anthocyanidines sur le développement des cancers. Ainsi, l'identification de molécules d'origine alimentaire agissant comme puissants inhibiteurs de l'angiogenèse pourrait représenter un progrès dans le développement de stratégies de prévention du cancer en particulier pour ceux du cerveau puisque les anthocyanidines sont capables de traverser la barrière hémocéphalique.

MOTS CLÉS : Périostine, Anthocyanidines, Angiogenèse, Intégrines, Prévention.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Statistiques

Malgré la prévention et les traitements mis en place, le cancer est l'une des causes majeures de mortalité au niveau mondial avec 8,2 millions de décès en 2012 selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). Au fait, 2 canadiens sur 5 développeront un cancer dans leur vie et 1 sur 4 en mourront (Société canadienne du cancer). Plus de la moitié des cancers touchant les Canadiens en 2015 (51%) seront des cancers du poumon, de la prostate, du sein et colorectaux. De plus, le nombre de nouveaux cas de cancer croît à chaque année. En effet, la Société canadienne du cancer estime à 196 900 nouveaux cas diagnostiqués de cancer en 2015 comparé à 153 126 nouveaux cas réels en 2005. Aussi, 30% des décès dus au cancer dans le monde seraient causés par les cinq facteurs de risques majeurs; un indice élevé de masse corporelle, une faible consommation de fruits et légumes, le manque d'exercice physique, le tabagisme et la consommation d'alcool (OMS). Le cancer est responsable d'environ 30% de tous les décès au Canada et est la maladie la plus coûteuse au Canada (OMS). Mis ensemble, ces faits soulignent l'importance et la nécessité des avancements de la recherche et des mesures de prévention de la maladie.

1.1.2 La cancérogenèse

Le cancer présente une importance unique dans la recherche scientifique qui a permis de bénéficier davantage des connaissances médicales de nos jours. Il est caractérisé par des cellules anormales qui croissent de façon illimitée et incontrôlable menant à la colonisation des autres tissus sains pour interférer avec la fonction des organes et finalement mener progressivement à la mort (Luqman et al., 2010). Le cancer est un processus qui requiert plusieurs étapes et qui prend plusieurs années à se développer. Cette maladie peut être causée par des facteurs génétiques, le style de vie, certains types d'infection et des expositions environnementales chimiques et aux radiations. Les différents types de cancers sont nommés d'après le tissu duquel les cellules cancéreuses originent. Le développement des cancers humains est un processus complexe impliquant différentes étapes; l'initiation, la promotion et la progression.

Dans les tissus sains, les cellules possèdent des mécanismes d'homéostasie capables de contrôler la production et le relâchement de signaux stimulateurs, l'apoptose, et plusieurs autres processus, assurant un bon fonctionnement des cellules. Or, ces signaux sont dérégulés dans les cellules cancéreuses (Foo et al., 2011). Ces cellules cancéreuses se distinguent des cellules saines par leurs capacités biologiques bien établies (Figure 1.1) (Hanahan et Weinberg, 2011). Elles maintiennent des signaux pour la prolifération cellulaire, échappent aux suppresseurs de tumeurs et à l'apoptose, se multiplient sans limites, favorisent l'angiogenèse, possèdent un potentiel invasif et métastatique, reprogramment le métabolisme énergétique, échappent à leur destruction par le système immunitaire, favorisent l'inflammation, et leur génome est instable permettant les mutations. Ces changements biologiques sont généralement dus à des altérations génétiques et épigénétiques pouvant survenir à chaque réplication cellulaire. Une accumulation d'altérations successives mène à l'activation d'oncogènes et à l'inactivation de suppresseurs de tumeurs permettant aux cellules de proliférer et de former une tumeur primaire (Miremadi et al., 2007).

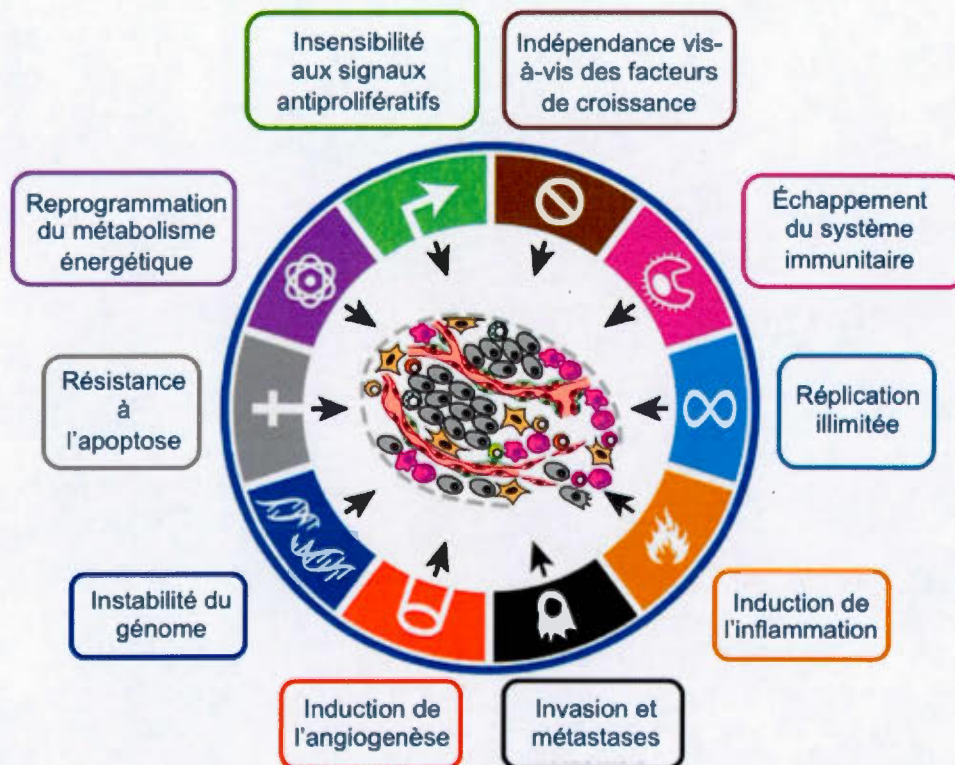


Figure 1.1 Caractéristiques du cancer. Les cellules tumorales acquièrent ces propriétés permettant la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Figure tirée et modifiée de Hanahan et Weinberg, 2011.

1.2 L'angiogenèse

1.2.1 L'angiogenèse physiologique vs pathologique

Pour que la tumeur primaire puisse proliférer davantage et ainsi permettre aux cellules cancéreuses d'atteindre d'autres sites d'organes distants, l'angiogenèse tumorale est essentielle. Généralement, lorsque la tumeur atteint un diamètre de 1-2 mm³, l'angiogenèse est initiée. L'angiogenèse est définie comme étant la formation de nouveaux capillaires à partir de microvaisseaux déjà existants. L'angiogenèse physiologique est importante dans la cicatrisation des tissus, le développement embryonnaire ainsi que la croissance des tissus reproductifs de la femme. En effet, les tissus sains ont besoin d'un vaste réseau vasculaire pour avoir accès aux nutriments et à l'oxygène nécessaire ainsi que pour l'élimination des déchets. Comme les tissus normaux, la tumeur nécessite des nutriments et de l'oxygène pour continuer de croître exponentiellement. L'angiogenèse impliquée dans le développement tumoral est ainsi nommée pathologique (Hanahan et Weinberg, 2011; Bergers et Benjamin 2003; Vallon et al., 2014).

Le système vasculaire normal est disposé dans une hiérarchie bien ordonnée : les capillaires, les artérioles, les veinules et les veines. Au contraire, le système vasculaire tumoral est désorganisé : les vaisseaux sont anormaux, dilatés, déformés avec un flux sanguin irrégulier, de branches irrégulières et incapables de pleinement capter les nutriments ainsi que d'éliminer les déchets métaboliques (Figure 1.2) (Nagy et al., 2010; Bergers et Benjamin 2003).

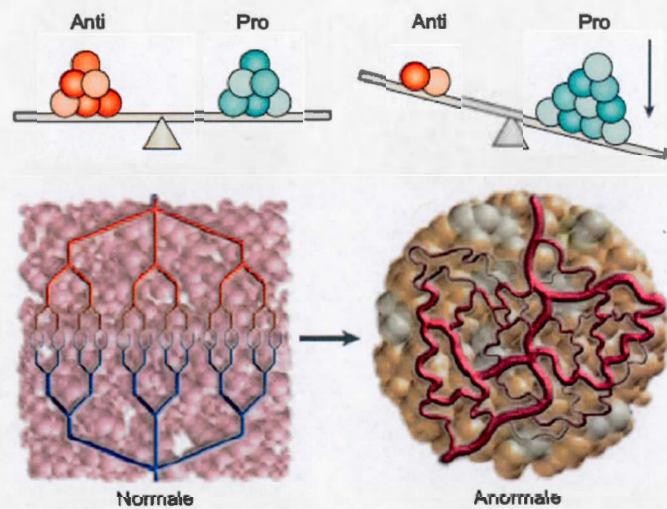


Figure 1.2 Angiogenèse physiologique (normale) vs pathologique (anormale). Dans les cellules en santé, un équilibre entre les facteurs anti- et proangiogénique maintient une vascularisation organisée et efficace. Dans les tumeurs, un déséquilibre favorisant les molécules proangiogéniques induisent un réseau vasculaire irrégulier et inefficace. Figure tirée et modifiée de Jain, 2005.

1.2.2 Les cellules de l'endothélium vasculaire

1.2.2.1 Généralités

Les cellules endothéliales sont connues pour jouer un rôle majeur dans l'angiogenèse et la vascularisation, qu'elles soient physiologiques ou pathologiques. Les cellules endothéliales constituent l'endothélium et tapissent tous les vaisseaux sanguins; les artères, les veines, les veinules et les capillaires. Étant la première couche de cellules en contact avec le sang, ces cellules endothéliales sont dynamiques et jouent plusieurs rôles. Elles sont capables d'exprimer différents marqueurs et d'engendrer différentes réponses au même stimulus tout dépendamment de leur localisation dans l'individu (organes et tissus), dans la structure vasculaire ainsi que des artères et capillaires qu'ils recouvrent. La structure des cellules endothéliales est importante pour le maintien de l'homéostasie agissant comme barrière semi-perméable des vaisseaux sanguins en contrôlant le transport de petites molécules, de macromolécules et d'hormones (Sumpio et al., 2002; Michiels et al., 2000; Bouïs et al., 2001).

1.2.2.2 La barrière hémocéphalique

Les cellules endothéliales du cerveau, les péricytes et les astrocytes constituent et maintiennent la barrière hémocéphalique (BHE) située entre le sang et le système nerveux central, contrôlant strictement les échanges pour un bon fonctionnement du cerveau. Comme toutes les cellules endothéliales, celles du cerveau contiennent des jonctions adhérentes entre elles formées par des protéines transmembranaires et intracellulaires, la famille des cadhérines et des caténines (Ballabh et al., 2004; Hainsworth et al., 2015). De plus, elles ont des jonctions serrées composées de la claudine, de l'occludine et de JAM (molécule d'adhésion de jonction) qui vont limiter le passage des molécules hydrophiles à travers la BHE protégeant ainsi le cerveau.

Les petites molécules dont le CO_2 et l' O_2 vont diffuser librement à travers la BHE tandis que l'entrée de grosses molécules et de nutriments comme le glucose et les acides aminés vont s'effectuer par des transporteurs (Ballabh et al., 2004; Hainsworth et al., 2014).

1.2.2.3 Phénotype et morphologie

Les cellules endothéliales dérivées des vaisseaux normaux diffèrent des cellules endothéliales dérivées du réseau vasculaire qui irrigue les tumeurs cérébrales. Morphologiquement, ces dernières sont plus larges et plates contenant plusieurs petits noyaux et un grand cytoplasme, incapables d'acquérir une apparence de "cobblestone-like", soit celle de galet typique des cellules endothéliales dites « normales ». En effet, ces dernières sont plus petites et d'apparence dodue avec un seul grand noyau et un cytoplasme limité (Figure 1.3) (Charalambous et al., 2006). Une autre caractéristique des cellules endothéliales dérivées de l'angiogenèse des tumeurs cérébrales est qu'elles migrent plus vite que les cellules endothéliales normales. Ainsi, les cellules endothéliales provenant de l'angiogenèse tumorale non traitées produisent davantage les facteurs VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) et ET-1 (endothéline-1), que les cellules endothéliales normales (Charalambous et al., 2005).

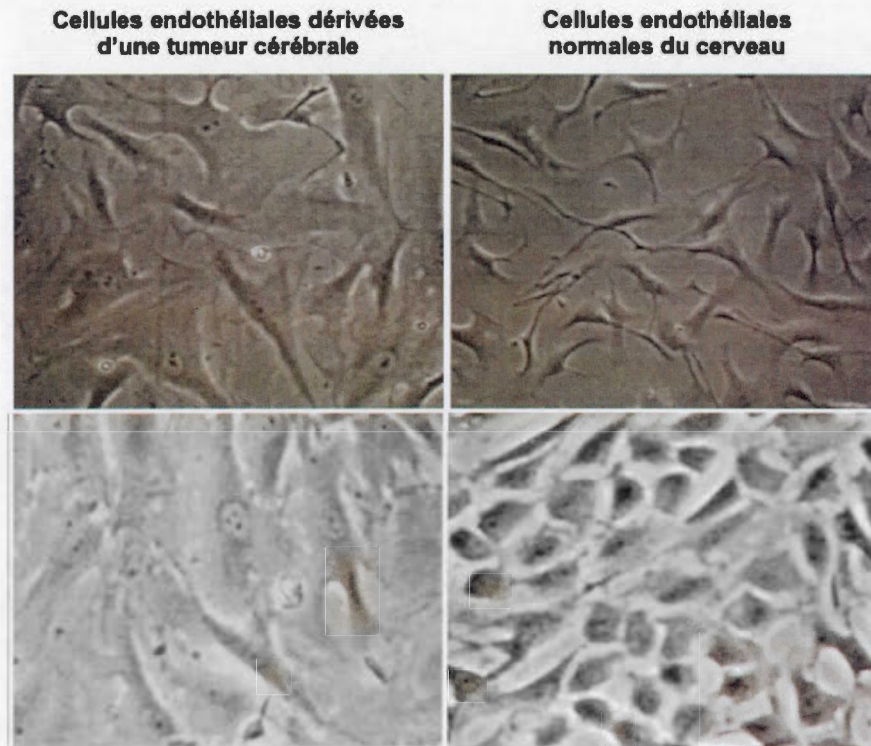


Figure 1.3 Caractéristiques morphologiques des cellules endothéliales normales du cerveau et dérivées de tumeurs cérébrales. Celles dérivées de tumeur cérébrale sont adhérentes, ont un cytoplasme abondant, un aspect plat et sont incapables d'acquérir une apparence de "cobblestone-like" (gauche). Celles normales du cerveau sont adhérentes, dodues, angulaires et acquièrent une apparence de "cobblestone-like" (droite). Figure tirée et modifiée de Charalambous, 2005.

1.2.3 Les étapes de l'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse normale est un processus hautement contrôlé impliquant des interactions avec les cellules endothéliales et son microenvironnement et d'une régulation des cytokines et des facteurs de croissance. En effet, le « switch angiogénique » est contrôlé par une balance dynamique entre les molécules proangiogéniques et antiangiogéniques. Certains facteurs de croissance, cytokines, protéases, oncogènes, et modulateurs endogènes dont l'hypoxie sont dits activateurs de l'angiogenèse. Lorsque ces activateurs se retrouvent plus nombreux que les inhibiteurs ou que les inhibiteurs sont régulés à la baisse, l'angiogenèse peut être initiée (Figure 1.4) (Bergers et al., 2003; Vallon et al., 2014; Jain et al., 2007).

L'angiogenèse peut survenir à différents moments tout au long de la progression tumorale tout dépendamment du type de tumeur et de son microenvironnement (Bergers et al., 2003). Le processus d'angiogenèse tumorale se produit en plusieurs étapes. La première étape comprend l'initiation de l'angiogenèse par la sécrétion des facteurs proangiogéniques (Nishida et al., 2006). Les facteurs proangiogéniques sont donc produits et sécrétés par les cellules tumorales vers les tissus environnants. Ceux-ci activent, via les récepteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins, des protéines capables de déclencher une cascade de signalisation intracellulaire. Les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) sont produites à la suite de ce signal et la membrane basale de la cellule est dégradée localement par les MMPs. Ceci permet aux cellules endothéliales de proliférer et migrer vers les signaux angiogéniques en même temps que la matrice existante est remodelée par les protéases. La fusion des deux colonnes migratoires est stabilisée par des jonctions cellule-cellule. Les cellules deviennent graduellement un réseau mature et stable de nouveaux vaisseaux sanguins (Figure 1.4) (Hanahan et al., 1996; Persson et Buschman, 2011; Welte et al., 2013; Bergers et Benjamin 2003).

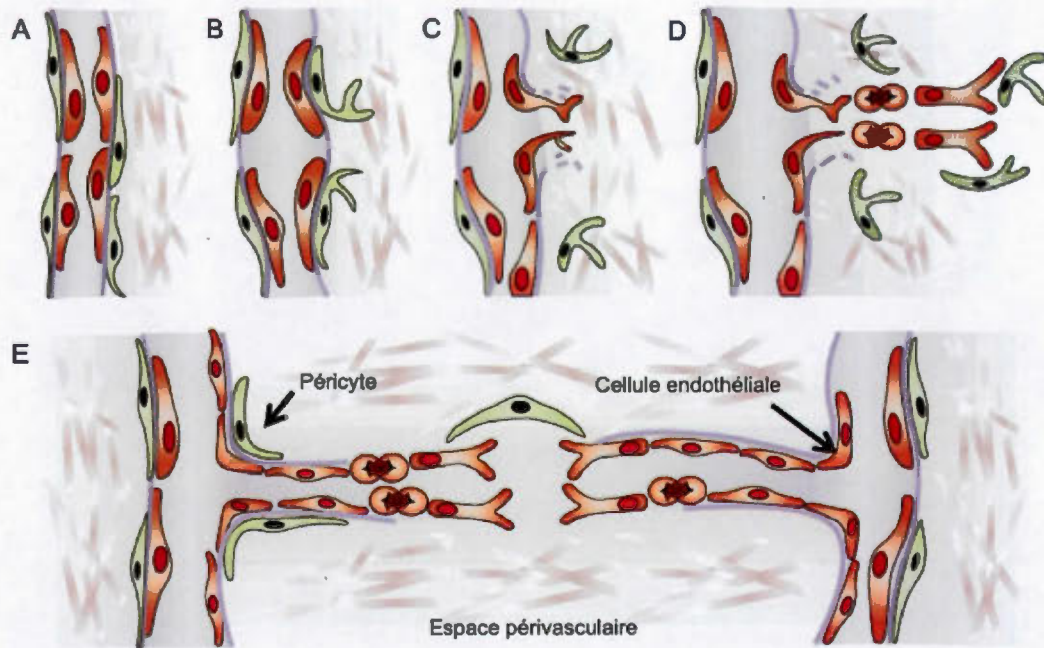


Figure 1.4 Étapes de l'angiogenèse. (A) La formation d'un nouveau vaisseau sanguin provenant des capillaires et des veinules préexistants est initiée par la sécrétion de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales. (B) Les péricytes (en vert) se détachent des vaisseaux sanguins (C) et la matrice extracellulaire est dégradée. (D) Les cellules endothéliales (en rouge) migrent ensuite vers les stimuli et prolifèrent en formant une colonne de migration dans l'espace périvasculaire. (E) Le remodelage tissulaire est engendré par la formation de la membrane basale, l'attachement des péricytes et des cellules les unes aux autres. Figure tirée et modifiée de Bergers et Benjamin, 2003.

1.2.4 Facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire

De tous les facteurs proangiogéniques, l'accent est principalement mis sur la famille de VEGF. Le VEGF est une protéine de 46 kDa et joue un rôle majeur dans l'angiogenèse tumorale. C'est une famille de 5 membres : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le facteur de croissance placentaire (PlGF) (Goel et Mercurio, 2013). Le gène VEGF comprend 8 exons séparés de 7 introns (Qiu et al., 2009). Le VEGF contient plusieurs isoformes créées par épissage alternatif de l'ARNm. Cette glycoprotéine est capable de transduire son signal principalement par les récepteurs à activité tyrosine kinase dont VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3, en combinaison avec les co-récepteurs neuropiline et également par les intégrines (Goel et Mercurio, 2013). La signalisation cellulaire médiée par VEGF favorise la croissance, la survie, la migration et l'invasion cellulaire par les voies de signalisation phosphoinositide 3-kinase – protéine kinase B (PI3K-AKT) et des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) (Goel et Mercurio 2013; Vallon et al., 2014). L'expression du VEGF peut également être régulée par la réponse des protéines non pliées (UPR), des hormones, des cytokines, certains oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs dont Src, Ras et p53 ainsi que plusieurs autres molécules de signalisation comme des molécules de la voie des MAPK (Vallon et al., 2014; Jain et al., 2007).

1.2.5 Hypoxie

En culture des tissus, le taux d'oxygène utilisé et considéré normal est d'approximativement 20% (160 mmHg) (Mohyeldin et al., 2010). Ce taux d'oxygène normal est nommé condition de normoxie. Cependant, dans le centre d'une tumeur solide, le réseau vasculaire est chaotique, non étanche et incapable de maintenir le niveau d'oxygène normal menant donc à l'angiogenèse tumorale (Höckel et Vaupel, 2001). Le niveau d'oxygène est beaucoup plus faible avec un taux de moins de 2% qui est nommé condition d'hypoxie. L'hypoxie peut être aiguë, engendrant une réduction de l'oxygène temporaire dans le sang, ou dite chronique qui comprend une vascularisation insuffisante menant à une altération des besoins de la tumeur (Walsh et al., 2014).

Lorsque le niveau d'oxygène est faible, les cellules vont soit s'adapter ou mener à la mort cellulaire. Dans le cas de tumeurs solides, les cellules tumorales vont exprimer le gène du facteur induit par l'hypoxie α (HIF-1 α). HIF-1 α favorise la régulation à la hausse de facteurs proangiogéniques dont le VEGF et l'interleukine-8 ainsi que la régulation à la baisse des molécules inhibitrices de l'angiogenèse dont l'angiostatine et l'endostatine (Carmeliet et Jain, 2000). Les cellules tumorales sont donc capables de s'adapter à leur microenvironnement par la stimulation de l'angiogenèse (VEGF), l'inhibition de l'apoptose [p53 et STAT3 (transducteur de signal et activateur de la transcription 3)], la reprogrammation du métabolisme énergétique [GLUT1 (le transporteur de glucose de type 1)], l'adaptation du milieu extracellulaire acide [CA-IX (l'anhydrase carbonique 9)], la survie cellulaire [NF- κ B (le facteur nucléaire kappa b)] et la régulation à la hausse des protéines et facteurs de transcription impliqués dans la métastase (SNAIL et TWIST) (Strese et Fryknäs 2013; McKeown 2014). Ainsi VEGF, HIF-1 α , GLUT1 et CA-IX représentent tous des marqueurs hypoxiques (Figure 1.5) (Walsh et Lebedev 2014).

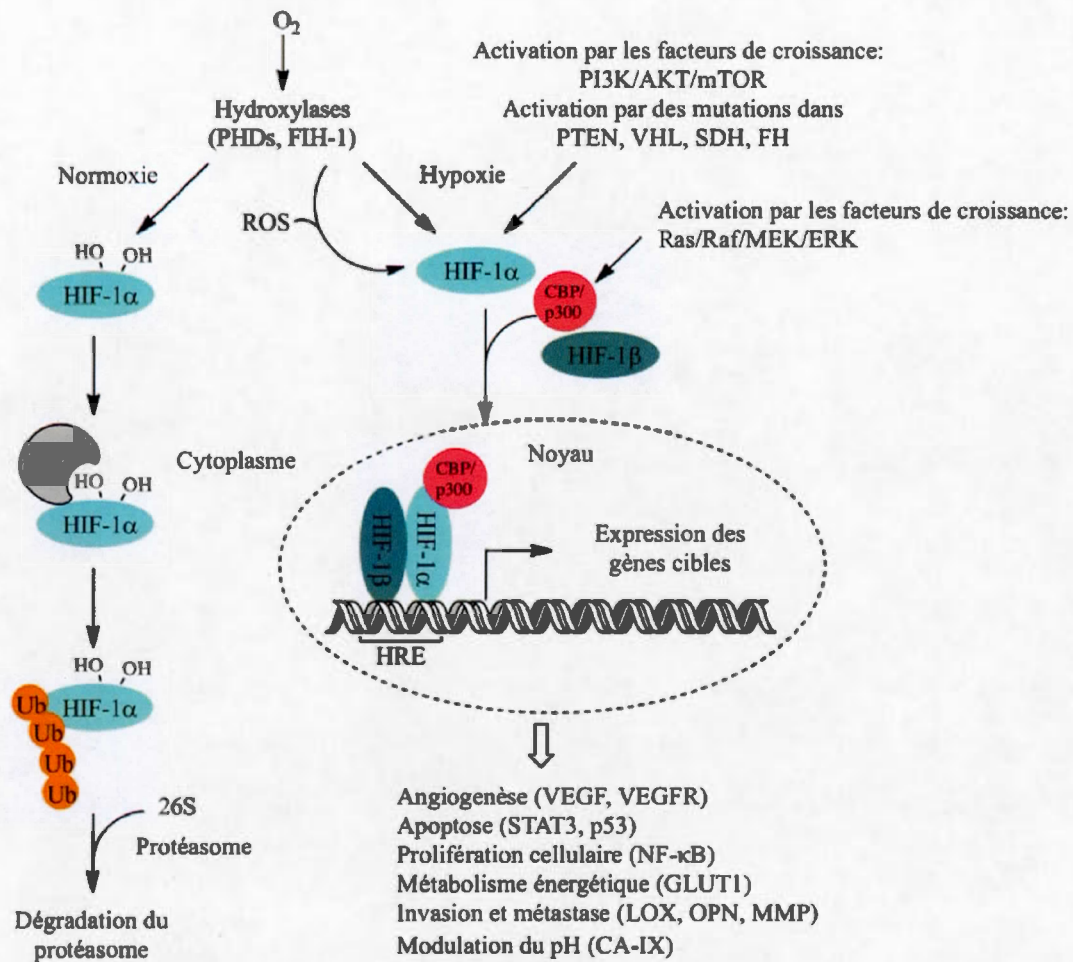


Figure 1.5 Régulation génique et protéique sous condition de normoxie vs hypoxie. En normoxie, l'hydroxylation de deux acides aminés proline et l'acétylation d'un acide aminé lysine de HIF-1 α désactive son activité et permet son association avec le supresseur de tumeur von Hippel-Lindau (VHL) menant à l'ubiquitination de HIF-1 α et sa dégradation par le protéasome. En hypoxie, VHL ne peut se lier à HIF-1 α conduisant à une accumulation de HIF-1 α dans la cellule. HIF-1 α interagit alors avec la protéine de liaison CREB/p300 (CBP/p300) et le gène du facteur induit par l'hypoxie β (HIF-1 β) conduisant à la régulation des gènes cibles impliqués dans différents processus moléculaire favorisant la croissance tumorale, la prolifération et le potentiel métastatique. Figure tirée et modifiée de Walsh et al. 2014.

En conditions d'aérobie, les cellules vont principalement utiliser la voie de la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS) étant donné qu'elle produit beaucoup plus d'ATP que la voie glycolytique. Dans ces conditions, le glucose est transformé en pyruvate dans le cytosol par glycolyse et produit deux molécules d'ATP. La phosphorylation oxydative mitochondriale utilise l'énergie qui est libérée par l'oxydation des nutriments, dont le pyruvate, pour produire 36 molécules d'ATP (Hanahan et Weinberg, 2011; Zheng, 2012).

Chaque cellule cancéreuse donne un rendement d'ATP différent selon la demande énergétique dépendamment des conditions cellulaires et de son microenvironnement. Dans la plupart des cellules cancéreuses, la glycolyse est augmentée tandis que la voie de la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS) est diminuée. Elles ont la capacité de reprogrammer leur métabolisme énergétique en utilisant principalement la glycolyse comme production d'énergie, que ce soit en condition de normoxie ou d'hypoxie. Cette reprogrammation appelée la glycolyse aérobie peut être causée par différents facteurs entre autres par des oncogènes, des suppresseurs de tumeurs, des mutations génétiques et principalement par un microenvironnement hypoxique. En effet, les cellules cancéreuses en hypoxie sont incapables d'obtenir l'ATP par phosphorylation oxydative avec la voie OXPHOS. Ces cellules vont alors utiliser la voie de la glycolyse, ce qui résulte en une demande en glucose plus élevée pour satisfaire les besoins énergétiques. Ceci mène donc à une régulation à la hausse de GLUT1 ainsi que des enzymes de la voie de la glycolyse par HIF-1 (Hanahan et Weinberg, 2011; Zheng, 2012; Lum et al., 2007). GLUT1 est un transporteur de glucose de type 1 et comprend 492 acides aminés. Aussi connu sous le nom de SLC2A1, GLUT1 facilite la translocation du glucose à travers la membrane cellulaire. Présentement, 14 transporteurs de glucose GLUT ont été identifiés chez l'humain et son rôle est effectué dans les érythrocytes, les muscles lisses, les astrocytes et les cellules endothéliales (Blodgett et al., 2007).

1.3 La migration cellulaire

1.3.1 Les principales étapes

La migration cellulaire est un processus nécessaire pour la progression tumorale. Celle-ci est initiée par la protrusion de la membrane cellulaire, une structure appelée lamellipode, filopode, pseudopode ou invadopode qui diffère selon la morphologie et la dynamique de la cellule (Friedl et Wolf, 2003). La cellule va exercer des forces de contact mécaniques par polymérisation et dépolymérisation produites par les filaments d'actine du cytosquelette. Ainsi, les cellules vont subir une réorganisation du cytosquelette pour modifier leur forme et leur rigidité et interagir avec les autres tissus par des interactions cellule-cellule ainsi que cellule-matrice extracellulaire telle la formation de contacts focaux. (Yamaguchi et Condeelis, 2007; Friedl et Wolf, 2003) Après l'extension de la cellule, une adhérence va se faire pour permettre au noyau ainsi qu'au contenu cellulaire de se déplacer pour ensuite séparer la partie arrière (Jacquemet et al., 2015). Les cellules tumorales peuvent se déplacer soit individuellement, processus retrouvé généralement dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), ou soit collectivement se déplaçant ainsi en feuilles, en cohortes, en chaîne ou en flux (Figure 1.6) (Mayor et Carmona-Fontaine, 2010).

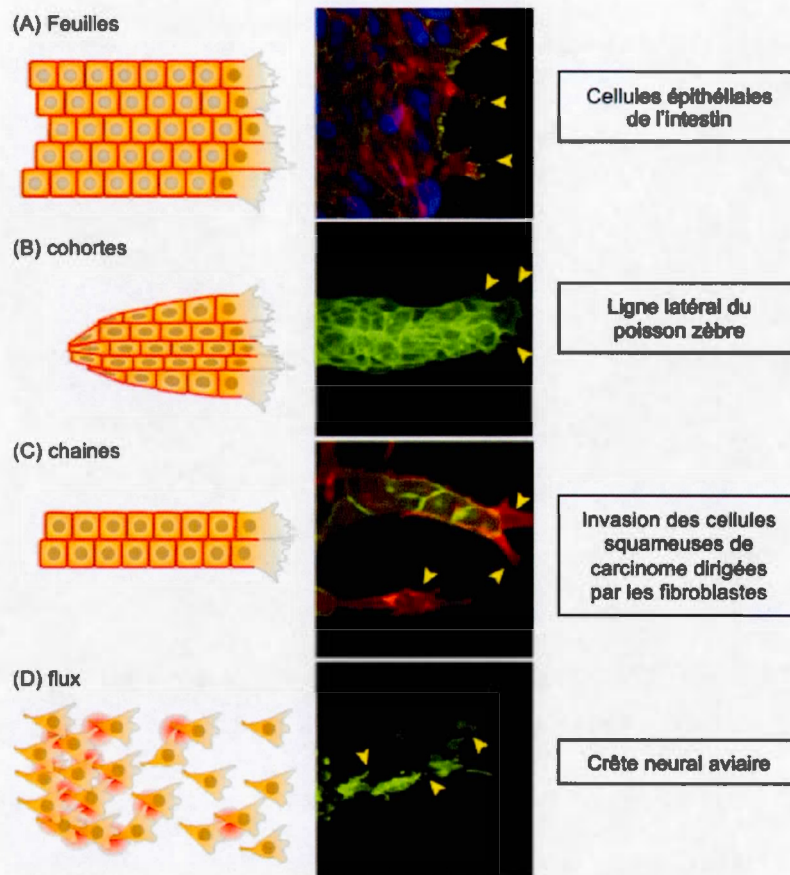


Figure 1.6 Exemples de migration cellulaire collective. Représentation schématique et microscopie par immunofluorescence des différents types de migration. Figure tirée et modifiée de Mayor et Carmona-Fontaine, 2010.

La migration cellulaire est initiée par une régulation de plusieurs molécules. La voie MAPK est un vaste réseau de signalisation qui régule plusieurs processus cellulaires fondamentaux dont la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la survie et également la migration. Les MAPK sont une famille hautement conservée de protéines kinases sérine/thréonine. Les MAPKKKs sont activées par phosphorylation par la liaison de protéines en réponse aux stimuli extracellulaire. Ces MAPKKKs vont phosphoryler et activer les MAPKK qui à leur tour vont phosphoryler les MAPK sur les acides aminés thréonine et tyrosine menant à la transcription de gènes cibles. Les 3 sous-familles les plus connues dans cette voie sont ERK1/2 (les kinases régulées par des signaux extracellulaire 1/2), p38 et JNK/SAPK (les kinases N-terminaux c-Jun / protéines kinases activées par le stress) (Guo et al., 2014; Cargnello et Roux, 2011).

1.3.1.1 La voie d'ERK

Les protéines ERK-1 et ERK-2 sont deux isoformes de poids moléculaires de 42 kDa et 44 kDa respectivement comprenant un motif Thr-Glu-Tyr (Caunt et McArdle, 2012). Leur activité est stimulée par différents facteurs de croissance, mitogènes, GPCR et autres. La voie de ERK1/2 est impliquée plus précisément dans les mouvements cellulaires par phosphorylation de MLCK (la kinase de la chaîne légère de myosine), calpaïne ou FAK (la kinase d'adhésion focale). L'activité de MLCK serait importante dans la protrusion de la membrane et le "turnover" des adhésions focales indispensable pour la migration cellulaire. Les calpaïnes sont une famille d'enzymes protéolytiques dépendante du calcium importantes dans la migration cellulaire et le "turnover" des adhésions. La tyrosine kinase FAK, localisée dans les adhésions et les contacts focaux, interagit avec la paxilline et formant ainsi un complexe impliqué dans la dissociation des adhésions focales. De plus, ERK

participe également dans la migration cellulaire en diminuant la capacité de liaison des intégrines et leurs ligands (Huang et al., 2004; Cargnello et Roux, 2011).

1.3.1.2 La voie de p38

La famille p38 MAPK comprend 4 isoformes; p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ et le site consensus de phosphorylation est Thr-Ala-Tyr (Pearson et al., 2001). Son activité est stimulée par différents facteurs de croissance et cytokines dont le VEGF, FGF (le facteur de croissance des fibroblastes), PDGF (le facteur de croissance dérivé des plaquettes), TNF (le facteur de nécrose tumoral), les interleukines et d'autres. Cette voie est importante dans l'orientation de la migration des cellules endothéliales et des muscles lisses ainsi que dans la réorganisation de l'actine par la phosphorylation de MAPKAP 2/3 suivie de celle de la protéine de choc thermique 27 (HSP27). De plus, les protéines paxilline et caldesmone participent à la migration en régulant la dynamique des adhésions focales et en stimulant l'urokinase respectivement (Huang et Jacobson, 2004; Cargnello et Roux, 2011).

1.3.1.3 La voie de JNK

Les protéines JNK/SAPK sont codées par trois gènes conduisant à au moins 10 isoformes dont JNK1/SAPK γ , JNK2/SAPK α et JNK3/SAPK β (Pearson et al., 2001). Les JNK/SAPKs ont un motif Thr-Pro-Tyr qui est activé par différents stimuli tels EGF (le facteur de croissance de l'épiderme), le TNF, le PDGF, TGF- β (facteur de croissance transformant β) et certains stress environnementaux. Cette voie régule la migration cellulaire par la phosphorylation de paxilline, impliquée dans le réassemblage d'adhésions focales et qui favoriserait la migration rapide des cellules,

les protéines associées aux microtubules, qui stabiliserait les microtubules, et Jun dont le mécanisme est encore inconnu (Huang et Jacobson 2004; Cargnello et Roux, 2011).

1.3.1.4 La voie de PI3K

De plus, une attention particulière a été portée sur la voie de signalisation PI3K/AKT qui est impliquée directement dans la migration cellulaire par l'activation des protéines G et des tyrosines kinases (Welf et Haugh, 2011). Les 3 membres les plus connus de la famille des Rho GTPases (enzyme hydrolysant la guanosine triphosphate); RhoA, Rac1 et Cdc42 (protéine de contrôle de la division cellulaire 42) participeraient à la régulation de la polymérisation de l'actine dans le cytosquelette. De plus, les 3 GTPases participent à l'invasion tumorale et à la métastase par la régulation de la formation des invadopodes et des protrusions de la membrane cellulaire riche en actine associés à la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) (Chi et al., 2013; Magi et al., 2012; Maffucci et al., 2005; Auer et al., 2011). Il est donc important d'identifier les acteurs des voies de signalisation pour être capables de mieux comprendre les interactions débalancées dans le cancer et en faire des cibles thérapeutiques.

1.4 Invasion tumorale et métastase

La métastase est la cause majeure de décès chez les patients atteints de cancer. Le processus de formation des métastases comprend plusieurs étapes où les cellules cancéreuses doivent outrepasser différents stress pour survivre et coloniser. Ces étapes comprennent le cisaillement hémodynamique, l'appauvrissement en nutriments, la perte d'adhérence, les conditions en hypoxie et l'accumulation de déchets biologiques (Kudo et al., 2007). La métastase consiste en des foyers cancéreux secondaires et est décrite comme étant la propagation de cellules cancéreuses à partir de la tumeur primaire vers les tissus avoisinants pour atteindre les organes via l'angiogenèse tumorale. La formation de la métastase comprend des interactions entre les cellules cancéreuses, les cellules de l'hôte (cellules endothéliales, fibroblastes, cellules épithéliales, cellules inflammatoires, etc.) et la MEC (Talmadge et Fidler, 2010).

Les différentes étapes de la dissémination métastatique impliquent l'invasion des cellules cancéreuses à partir de la tumeur primaire à travers le stroma tumoral ainsi que le parenchyme des tissus adjacents normaux. Pour ce faire, les cellules peuvent initier la TEM, un processus complexe où les cellules cancéreuses perdent leurs propriétés adhésives et gagnent des propriétés migratrices et protéolytiques nécessaires à la formation de métastases. La TEM survient après l'activation des facteurs de transcription comme Snail, Slug et Twist et une surexpression des protéines fibronectine, vimentine, N-cadherine et β -catenine est suivie ainsi qu'une sous expression de E-cadherine (Lamouille et al., 2014; Kalluri et Weinberg, 2009). Les cellules vont donc modifier leur ancrage cellulaire en modifiant l'expression des molécules d'adhésion pour diminuer les jonctions intracellulaires. De plus, les MMPs vont dégrader la membrane basale par leur activité protéolytique ainsi que sécréter des facteurs de croissance pour induire et maintenir le signal de prolifération et

permettre la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Radisky et Radisky, 2010).

L'entrée des cellules tumorales dans la circulation lymphatique et sanguine est l'étape de l'intravasation. Dans cette étape, les cellules tumorales vont subir des changements moléculaires pour aider à traverser le mur des microvaisseaux qui comprend les cellules endothéliales et les péricytes (Ganguly et al., 2013). L'étape suivante consiste en la survie des cellules tumorales dans la circulation. Ces cellules doivent survivre et surpasser différents stress dont éviter le système immunitaire pour atteindre un environnement sûr afin de parvenir à un site d'organes distant (Valastyan et Weinberg, 2012). Après s'être arrêtées à ce site, les cellules vont commencer à croître et former une micro-colonie pour ensuite quitter les vaisseaux et traverser les cellules endothéliales et les péricytes. Cette étape est appelée l'extravasation. Les cellules tumorales doivent finalement s'adapter et survivre avant de pouvoir coloniser l'organe et former la métastase dans ce nouveau microenvironnement.

1.5 La périostine

1.5.1 Structure génique et protéique

La périostine, qui fut d'abord appelée *Osteoblast Specific Factor 2* (OSF-2), est une protéine de la MEC d'environ 93 kDa encodée par le gène *POSTN* (Genbank D13665). La *POSTN* est localisée sur le chromosome 13 chez l'humain et fait partie de la famille des fasciclins. Elle partage une homologie avec la molécule d'adhésion cellulaire fascicline 1 identifiée chez les insectes tout comme β ig-h3, stabline I et II, la protéine basique de myéline (MBP-70), Algal-CAM et *periostin-like-factor 1* et 2 retrouvés chez l'humain (Conway et al., 2014).

La région N-terminale de la protéine hautement conservée possède un peptide signal (SP) pour la sécrétion de la protéine dans la MEC ainsi qu'un domaine Emilin-like (EMI) riche en cystéine d'environ 75 acides aminés. La région N-terminale va réguler la fonction cellulaire tandis que la région C-terminale va réguler l'organisation et les interactions de la MEC avec d'autres protéines de la MEC dont le collagène I/V, la fibronectine, la tenascine C, l'héparine ainsi que la périostine elle-même (Morra et Moch, 2011). Les 4 régions homologues répétées fasciclin-like (FAS), retrouvées en aval du domaine EMI et du peptide signal (SP), permettent la liaison avec les intégrines et les glycosaminoglycanes à la membrane plasmique. Ces régions sont suivies par la région C-terminale qui comprend un domaine hydrophile et varie selon les isoformes (Figure 1.6). Présentement, 7 isoformes de la périostine ont été identifiées avec un poids moléculaire variant de 80 à 93 kDa et dont 4 isoformes sont complètement séquencées chez l'humain. (UniProtKB - Q15063) (Ruan et al., 2009; Bai et al., 2010; Kudo et al., 2007).

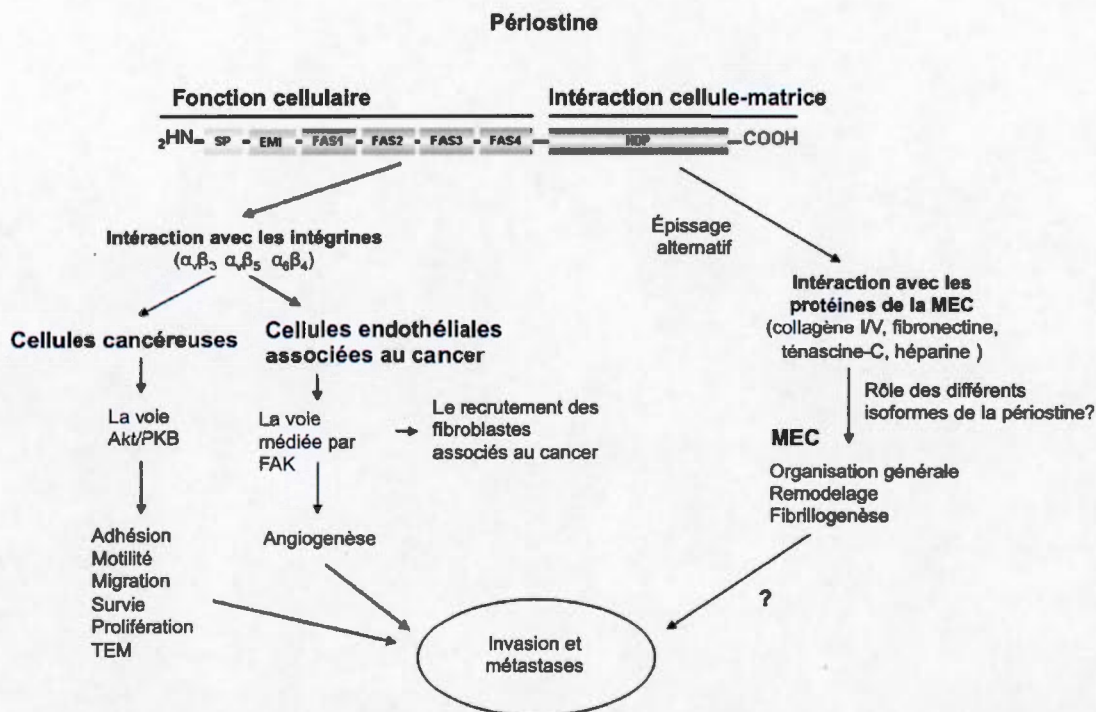


Figure 1.7 Rôle de la périostine dans le cancer. La région N-terminale de la périostine est responsable de la fonction cellulaire et la région C-terminale, des interactions cellule-matrice. La périostine interagit avec les intégrines par ses domaines FAS activant différentes voies de signalisation et avec des protéines matricielles induisant le remodelage de la MEC conduisant ainsi à l'invasion tumorale et la métastase. Figure tirée et modifiée de Mora et Moch, 2011.

1.5.2 Rôle dans les tissus sains

L'OSF-2 spécifique des ostéoblastes isolé des cellules MC3T3-E1 d'ostéoblastes de la souris a été renommé périostine pour sa forte expression dans le périoste, une membrane recouvrant les os (Horiuchi et al., 1999). L'expression génique de la périostine a été détectée dans les tissus sains de l'estomac, l'aorte, le tractus gastro-intestinal, le placenta, l'utérus et du sein et son expression protéique a été détectée dans les tissus sains des glandes surrénales, des poumons, la thyroïde, l'estomac, le côlon, les ovaires, les testicules et la prostate (Gillan et al., 2002; Tai et al., 2005). Cette protéine est connue essentielle pour la formation et la maintenance des os et des dents, le développement du cœur et la cicatrisation à la suite d'un infarctus du myocarde.

En effet, lorsque la périostine est exprimée dans les tissus, la sclérosine est diminuée ce qui favorise le remodelage et la préservation de la masse osseuse. Inversement, lorsque la sclérosine est exprimée et que la périostine est absente dans les tissus, l'inhibition de la formation osseuse par la sclérosine conduit à une perte de la masse osseuse (Conway et al., 2014). Aussi, des niveaux élevés de périostine ont été détectés dans les tissus du périoste non différenciés lors du remodelage et du développement de l'os pendant les étapes préliminaires de la guérison d'une fracture ou d'un stress (Nakasawa et al., 2004). La périostine est également impliquée dans la régénération des tissus par une augmentation de son expression dans les tissus endommagés. Plus précisément, en absence de périostine, un délai de la cicatrisation des cellules était observé *in vivo* ainsi qu'une diminution de la prolifération et de la migration *in vitro*. En administrant directement la périostine, une amélioration de la cicatrisation était démontrée *in vivo* ainsi qu'une amélioration de la prolifération *in vitro* (Ontsuka et al., 2012). De plus, la périostine joue un rôle dans le développement des valves du cœur ainsi que le remodelage pulmonaire néonatal. Celle-ci est capable de réguler la production de collagène dans les tissus (Conway et al., 2014). La

périostine est un médiateur des propriétés biomécaniques dans les tissus conjonctifs fibreux en régulant la fibrillogenèse du collagène (Norris et al., 2007).

1.5.3 Expression et fonction dans le cancer

La périostine n'est pas seulement exprimée dans les tissus sains mais aussi dans différentes maladies dont le cancer. Celle-ci est impliquée dans la spondylarthrite ankylosante, la pneumonie interstitielle idiopathique, la fibrose pulmonaire idiopathique, l'inflammation et la fibrose rénale, les maladies allergiques et le cancer (Conway et al., 2014; Liu et al., 2014). Selon la littérature, la périostine est surexprimée dans plusieurs types de cancer dont les neuroblastomes, le cancer de la tête et du cou, le carcinome du nasopharynx, le carcinome de la thyroïde, le cancer du poulmon, du sein, du côlon, des ovaires et l'adénocarcinome pancréatique (Tilman et al., 2007). De plus, un niveau élevé de périostine est retrouvé dans le sérum de patients atteints de différents cancers dont le thymome, l'adénocarcinome pancréatique, le cancer du sein et du poulmon. La surexpression de la périostine dans les tissus serait associée avec l'agressivité de la tumeur d'où l'importance de mieux comprendre le mécanisme de la périostine dans le cancer (Kudo et al., 2007; Ruan et al., 2009).

La progression tumorale est un processus complexe impliquant plusieurs étapes dans lesquelles l'angiogenèse et la métastase sont importantes. Cette progression est médiée par plusieurs protéines dont la périostine. Celle-ci joue un rôle important dans le cancer par le remodelage du microenvironnement des tissus lors de la croissance tumorale, l'angiogenèse tumorale, la migration cellulaire, l'invasion tumorale et la métastase.

Certaines études ont démontré qu'une induction de l'expression de la périostine favorise la survie des cellules tumorales et endothéliales ayant subi des conditions de stress dont l'hypoxie (Bao et al., 2004; Baril et al., 2007; Erkan et al., 2007). La périostine joue également un rôle important dans l'adhésion, la migration et la survie cellulaire des cellules cancéreuses du pancréas ainsi que dans l'inflammation par exemple, en recrutant les macrophages associés aux tumeurs (TAM) M2 dans les cellules souches de glioblastomes favorisant la croissance tumorale (Baril et al 2006; Zhou et al., 2015). D'autres études ont démontré une implication de la périostine dans la TEM des cellules de carcinome (Morra et Moch, 2011). En effet, lorsque la périostine est régulée à la hausse, les marqueurs mésenchymateux vimentine, fibronectine et la MMP-9 active sont régulés à la hausse, ce qui démontre une induction de la TEM (Yan et Shao, 2006). De plus, à la suite d'une surexpression de la périostine, un changement morphologique des cellules est observé et une induction de la TEM est démontrée par la sous-expression de la protéine E-cadhérine médiée par le facteur de transcription Snail (Kim et al., 2011). La périostine est non seulement un inducteur mais aussi un marqueur de la TEM (Wei et al., 2015).

Plus important encore, la périostine est impliquée dans l'angiogenèse tumorale étant définie comme un facteur de l'angiogenèse dans la croissance tumorale. Plusieurs études ont démontré que la surexpression de la périostine détectée dans les cellules cancéreuses mène à l'angiogenèse tumorale en augmentant la survie des cellules endothéliales et l'expression du récepteur au VEGF, Flk-1/KDR (Shao et al., 2004; Siriwardena et al., 2006; Bao et al., 2004). Des études *in vitro* ont aussi démontré l'implication de la périostine dans l'angiogenèse en augmentant la formation de capillaires dans les cellules de carcinome épidermoïde orale (Siriwardena et al., 2006). Il a été suggéré que la périostine pourrait être impliquée dans l'invasion tumorale et la métastase par sa surexpression dans les métastases de différents cancers dont les mélanomes, le cancer de la tête et du cou, de l'estomac et des ganglions lymphatiques ainsi que dans les sérums de différentes tumeurs dont du

thymome (Li et al., 2007; Tilman et al., 2007; Kudo et al., 2006; Sasaki et al., 2001). L'importance de la périostine dans les cancers secondaires, les métastases, a été découverte par une équipe de Suisse en 2012. Ces scientifiques ont affirmé qu'une protéine cible, la périostine, est essentielle à la colonisation des métastases en régulant les interactions entre les cellules souches cancéreuses du sein et le nid métastatique. Effectivement, en bloquant la fonction de la périostine par un anticorps, les cellules souches cancéreuses sont incapables d'initier et d'établir la métastase (Malanchi et al., 2012). Cette protéine pourrait alors représenter une cible thérapeutique importante.

1.5.4 Les intégrines : récepteurs de la périostine

La périostine est capable de transduire son signal en se liant spécifiquement aux intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_6\beta_4$ favorisant ainsi le cancer (Kudo et al. 2007; Gillan et al. 2002; Morra et Moch, 2011; Conway et al. 2014; Bao et al. 2004). Bien entendu, l'expression des intégrines est altérée dans la majorité des cancers menant à un débalancement de l'activation des voies de signalisation. Ces cascades de signalisation intracellulaires sont capables de favoriser la progression tumorale et la métastase. (Ruan et al., 2009). Les intégrines sont des récepteurs à la surface des cellules capables de lier les protéines de la MEC et de médier les interactions cellule-cellule. Elles sont connues pour réguler plusieurs processus cellulaires par différentes voies de signalisation intracellulaire dont le développement embryogénique, la croissance des cellules tumorales et la métastase, la mort cellulaire programmée, l'homéostasie de la cellule, l'activation des leucocytes, la résorption des os et les réponses au stress mécanique cellulaire (Clark et al., 1995). Les intégrines sont formées par une liaison non-covalente d'une unité α et d'une unité β avec un poids moléculaire variant entre 120-180 kDa et 90-110 kDa respectivement formant un hétérodimère. Ces sous-unités peuvent former plus de 20 différentes intégrines

exprimées à différents niveaux dans une grande variété de cellules (Hynes et al., 1992).

Des études ont démontré la liaison de la périostine avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ dans les cellules cancéreuses des ovaires, du sein, du côlon et de la bouche ce qui favorise l'adhésion et la migration des cellules épithéliales (Gillian et al., 2002; Bao et al., 2004; Shao et al., 2004; Kudo et al., 2006). La périostine se lie également avec l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ dans les cellules cancéreuses du pancréas favorisant la migration cellulaire (Baril et al., 2006). Elle serait également impliquée dans la survie cellulaire des cellules cancéreuses du côlon par sa liaison à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Bao et al., 2004). De plus, l'expression du récepteur VEGF, jouant un rôle dans l'angiogenèse, serait augmentée suite à l'interaction de la périostine et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Shao et al., 2004).

1.5.5 Voies de signalisation intracellulaire de la périostine

La périostine sécrétée excessivement dans la MEC contribue à des réponses inflammatoires et à la progression tumorale en interagissant avec les intégrines mais aussi avec d'autres protéines de la MEC pour réorganiser le microenvironnement du tissu et réguler certaines voies de signalisation (Liu et al., 2014). Il est important d'étudier et de connaître davantage le mécanisme d'action exact de la périostine dans les différents tissus cancéreux jouant un rôle majeur dans le cancer. Actuellement, des études ont exploré quelques voies de signalisation médiées par la périostine dans différents tissus cancéreux, dont les voies PI3K/Akt, FAK, ERK et Wnt.

En effet, la phosphorylation de Akt et de FAK est augmentée suite à l'interaction de la périostine et de l' $\alpha_6\beta_4$ ce qui mène à l'activation de la voie PI3K/Akt favorisant la motilité et la survie cellulaire (Baril et al., 2006). Aussi, lorsque la périostine se lie avec l'intégrine $\alpha v\beta_3$, il y a une augmentation de la phosphorylation de FAK sur la tyrosine 681 ainsi que du récepteur au VEGF, Flk-1/KDR, dans les cellules endothéliales microvasculaires du derme (HMVEC) (Shao et al., 2004). De même, Src et Akt sont activés par la périostine dans les cellules endothéliales lymphatiques favorisant la lymphangiogenèse (Rota et al., 2012). La périostine est également capable d'activer la voie ERK par l'induction de la phosphorylation de ERK1 et ERK2 dans les lignées cellulaires de l'estomac OCUM-2MLN et OCUM-12 (Kikuchi et al., 2014). De plus, la périostine interagit avec des ligands de la voie Wnt, Wnt1 et Wnt3A, qui induit la voie Wnt dans les cellules souches et permettrait de favoriser la colonisation des métastases (Malanchi et al., 2012).

Bien que la périostine soit capable de réguler certaines voies de signalisation, l'expression de celle-ci peut également être régulée par des molécules comme le TGF- β , BMP-2 (protéine morphogénique osseuse), Twist, FGF-1, l'angiotensine II, Wnt-3, IL-4 (interleukine-4) et IL-13 (interleukine-13). Par exemple, l'expression de la périostine est augmentée par TGF- β , BMP-2, et Twist dans les cellules d'ostéoblastes primaires (Horiuchi et al., 1999). Plus précisément, le facteur de transcription Twist, impliqué dans la TEM, se lie au promoteur de la périostine pour réguler son expression (Oshima et al., 2002). En ce qui concerne l'angiotensine II et FGF-1, ceux-ci augmentent l'expression de la périostine dans les cellules musculaires lisses isolées des artères du poumon (Li et al., 2004). Wnt-3 régule la périostine dans les cellules endothéliales mammaires de souris et les interleukines IL-4 et IL-13 induisent la sécrétion de la périostine dans les fibroblastes du poumon (Wiesmann et al., 2000; Takayama et al., 2006; Masuoka et al., 2012).

1.6 Nutrition et cancer

1.6.1 Les aliments et la prévention du cancer

La guerre contre le cancer est l'un des plus grands défis dans le monde. Il est estimé que 75% des cancers pourraient être évités par un mode de vie sain, surtout dans les pays industrialisés, en maintenant une bonne alimentation, en étant physiquement actif et en gardant un poids santé (Anand et al., 2008; Béliveau et Gingras, 2014). Il a été démontré que plusieurs facteurs peuvent influencer le risque de développer un cancer entre les différentes populations comme l'âge, le régime alimentaire, le style de vie, l'accès au soin de santé, les barrières culturelles ainsi que l'exposition aux agents carcinogènes et pathogènes (Wallace et al., 2011).

En effet, plus de 7000 études épidémiologiques et expérimentales évaluées par le Fonds Mondial de Recherche contre le cancer ont démontré, entre autres, un lien étroit entre l'apport de fruits et légumes au quotidien et la réduction du risque de développer un cancer. La consommation d'aliments d'origine végétale dont les fruits, les légumes, les grains entiers, les épices et le thé vert, constitue une forme de chimiothérapie préventive (Béliveau et Gingras 2005 et 2014). Plusieurs études ont démontré qu'une panoplie de facteurs dont les vitamines E, D₃, C, les polyphénols, les fibres, le calcium, le soja, le sélénium, les Omega-3 et les rétinoïdes sont capables d'inhiber et interférer certaines étapes essentielles à l'apparition et la progression tumorale. Tandis que les protéines, les lipides, le chlorure de sodium, les nitrites, les nitrates ainsi que le tabac, favorisent le cancer (Divisi et al., 2006). Le Fonds mondial de recherche contre le cancer a établi 10 recommandations pour prévenir le cancer. Ces recommandations consistent à cesser de fumer, garder un indice de masse corporel entre 21 et 23, réduire la consommation de viandes rouges, avoir une alimentation riche et variée de fruits et légumes, légumineuses ainsi que d'aliments à base de grains entiers, être actif physiquement, limiter la consommation d'alcool, de

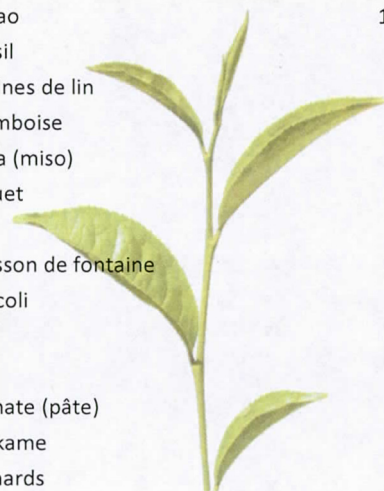
produits contenant beaucoup de sel, protéger la peau du soleil, ne pas utiliser de suppléments et suivre à la lettre ces 10 recommandations en particulier pour les survivants du cancer. (Béliveau et Gingras, 2014; WCRF).

1.6.2 Les phytochimiques

Les composés phytochimiques sont des molécules provenant des plantes ayant des propriétés de protection leur permettant de se défendre contre plusieurs stress environnementaux. Les phytochimiques sont séparés en trois familles principales; les composés phénoliques, les composés soufrés et les terpènes, classés selon leurs structures (Tableau 1.1). Certains composés phytochimiques possèdent des propriétés anticancéreuses. Ceux-ci sont capables de bloquer l'initiation et différentes étapes dans le processus de la cancérogenèse ainsi que de garder les tumeurs microscopiques dans un état latent et inoffensif. Ces molécules agissent souvent en synergie leur donnant un potentiel chimiopréventif maximal. Il est estimé qu'une seule portion de légume peut contenir plus de 100 composés phytochimiques bien que plus de 5000 molécules phytochimiques soient connues de nos jours dans les fruits et légumes (Surh et al., 2003; Rui et al., 2004). Cependant, une molécule phytochimique ne contient pas toutes les propriétés pharmacologiques pour tous les types de cancers et maladies. C'est pourquoi il est important de consommer une variété d'aliments contenant ces molécules anticancéreuses (Béliveau et Gingras 2005 et 2014).

Tableau 1.1 Principales sources alimentaires des différentes familles de composés phytochimiques aux propriétés anticancéreuses. Figure tirée et modifiée du livre; Les aliments contre le cancer de Béliveau et Gingras, 2005.

Famille	Exemples de molécules	Meilleures sources	Contenu (mg/100 g)
Polyphénols 	Épigallocatechine gallate (EGCG)	Thé vert	8 295
	Proanthocyanidines	Cacao	1 373
	Apigénine	Persil	302
	Lignanes	Graines de lin	300
	Acide ellagique	Framboise	150
	Génistéine	Soya (miso)	36
	Delphinidine	Bleuet	30
Composés soufrés	PEITC	Cresson de fontaine	400
	Sulforaphane	Brocoli	290
	Allicine	Ail	4
Terpènes	Lycopène	Tomate (pâte)	75
	Fucoxanthine	Wakame	32
	Zéaxanthine/Lutéine	Épinards	30



1.6.3 Les anthocyanidines

Les anthocyanidines font partie de la famille des flavonoïdes et sont des colorants naturels ayant une teinte de bleu, mauve ou rouge. Ces molécules sont solubles dans l'eau et sont principalement consommées dans les aliments dérivés de source végétale dont les bleuets, les raisins, les pommes, le chou rouge et certaines fleurs (Farrukh et al., 2014). Les bleuets sont reconnus pour être riches en anthocyanidines. Cependant, la composition des molécules peut varier entre les différentes variétés de plantes et les conditions environnementales (Flamini et al., 2013). Wu et al., 2006, ont estimé la consommation moyenne d'anthocyanines à environ 12.5 mg par jour aux États-Unis et une seule portion de petits fruits peut en contenir environ 100-300 mg (McGhie et al., 2003).

1.6.3.1 Structure chimique

Les anthocyanidines sont naturellement retrouvées dans les fruits sous forme de glycoside ce qui leur donne une meilleure stabilité. Sous cette forme, elles sont appelées anthocyanines. Ces anthocyanines sont ainsi synthétisées à partir des anthocyanidines par glycosylation en attachant soit un glucose, un galactose, un rhamnose, un xylose ou un arabinose généralement sur le carbone 3 (Wang et Stoner, 2008). La structure des anthocyanidines diffère selon le nombre et la position des groupements hydroxyles et méthyles sur le noyau B. Il y a environ 17 anthocyanidines identifiées, mais seulement six d'entre elles sont assez répandues dans la nature : la delphinidine (Dp), la pélagonidine (Pg), la pétunidine (Pt), la péonidine (Po), la cyanidine (Cy) et la malvidine (Mv) (Figure 1.8) (Kamiloglu et al., 2015).

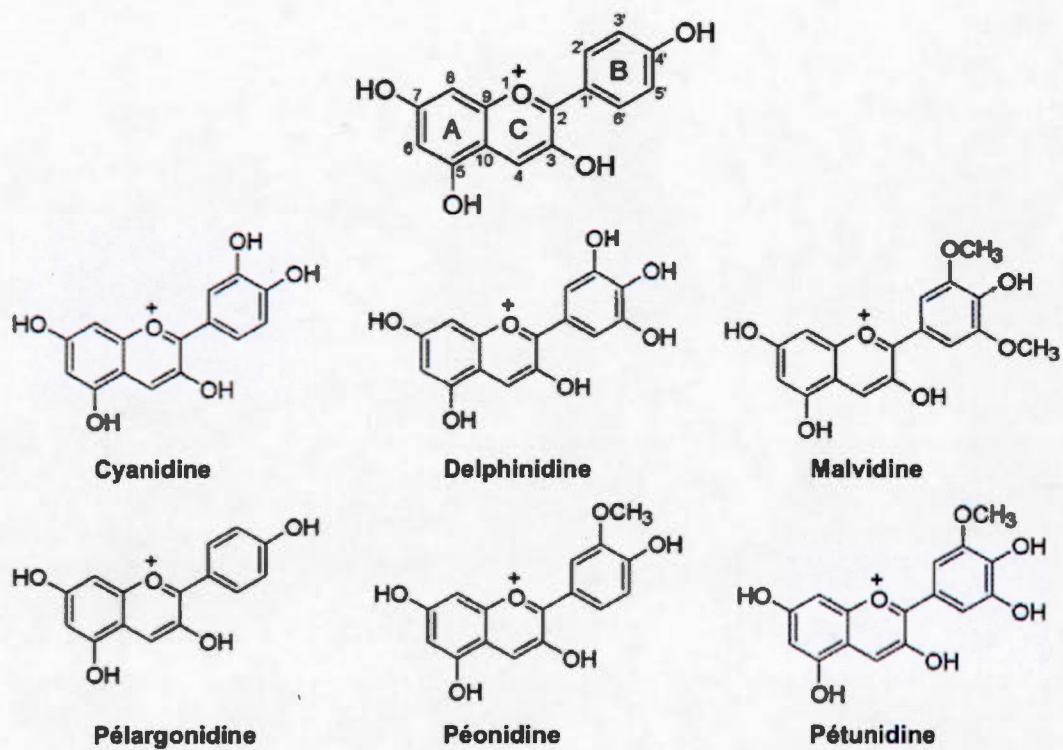


Figure 1.8 Structure chimique des principales anthocyanidines. Figure tirée et modifiée de Yuan et al., 2012.

1.6.3.2 Effets bénéfiques

Depuis des siècles, les anthocyanines sont des composantes faisant partie de la médecine traditionnelle à base de plantes et qui étaient utilisées par les indiens de l'Amérique du Nord, les européens et les chinois. Celles-ci donneraient une protection contre les lésions du foie, une réduction de la pression artérielle, une amélioration de la vue, un anti-inflammatoire puissant et une activité antimicrobienne et ainsi pourraient prévenir certaines maladies comme le cancer (Konczak et Zhang, 2004). Les anthocyanidines ont démontré, d'après plusieurs recherches, des propriétés anticancéreuses. Ces effets sont principalement attribués à leur structure phénolique, plus précisément à leur groupement hydroxyle, leur donnant une activité antioxydante. Les anthocyanines ont la capacité de piéger les espèces réactives d'oxygène (ROS) dont O_2^- , ROO^- , H_2O_2 et OH) ainsi que de chélater les métaux et de se lier directement aux protéines. Ces effets ont été démontrés dans différentes lignées cellulaires du côlon, du foie, des cellules endothéliales, du sein, des cellules leucémiques et des kératinocytes (Wang et Stoner, 2008). Ces anthocyanines sont également capables d'induire la phase II des enzymes en induisant les enzymes reliés au glutathion et l'activité du NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) (Shih et al., 2007). De plus, les anthocyanidines delphinidine, pélargonidine, pétunidine, cyanidine et malvidine semblent empêcher les différentes étapes du cycle cellulaire résultant d'une inhibition de la prolifération cellulaire dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Zhang et al., 2005).

Une étude menée à l'Université Kagoshima au Japon a démontré, dans les cellules JB6, que la delphinidine bloque la phosphorylation de MEK, SEK et c-JUN qui font partie des voies de signalisation ERK et JNK contribuant ainsi à l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses (Hou et al., 2003). L'apoptose est induite par les anthocyanines en modulant les protéines proapoptotiques dans les cellules leucémiques HL-60 (Chang et al., 2005). Aussi, certaines anthocyanines ont démontré une inhibition de l'expression génique et protéique de COX-2 (cyclooxygénase-2), NF- κ B et de certaines interleukines leur conférant des effets anti-inflammatoires (Wang et Stoner 2008). Une inhibition des MMPs par la delphinidine dans les cellules de fibrosarcome HT-1080 a démontré une implication de l'effet anti-invasif des cellules tumorales (Nagase et al., 1998). De plus, les cellules HL-60 traitées avec l'anthocyanine Cy-g indiquent une induction de la différenciation des HL-60 (Fimognari et al., 2004). Une étude a également démontré des effets antimigratoires par les anthocyanidines Dp, Cy et Pt dans les glioblastomes U-87 (Lamy et al., 2007).

Les anthocyanidines ont également des effets antiangiogéniques en inhibant VEGF et le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR- β) dans les HUVEC et les SMC, respectivement (Lamy et al. 2005 et 2008). Aussi, la Dp, la Cy et la Mv ont démontré cet effet par une inhibition de la formation de capillaires induit par VEGF dans un modèle de co-culture dans les HUVEC et les fibroblastes (Matsunaga et al., 2010). De même, la diminution de l'expression de VEGF et HIF-1 α a été démontrée par un extrait de maïs pourpre riche en anthocyanidines (Kang et al., 2013).

CHAPITRE II

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

2.1 Problématique

Des études épidémiologiques établissent une relation étroite entre la nature du régime alimentaire et le risque de développer plusieurs cancers. Il a été confirmé que les molécules phytochimiques contenues dans les fruits et légumes peuvent prévenir et même freiner le développement d'une grande variété de cancers. La progression tumorale est un processus complexe qui implique plusieurs étapes dans lesquelles l'angiogenèse et la métastase sont médiées, entre autres, par la périostine, une protéine de la MEC. Cette protéine est surexprimée dans divers cancers pouvant activer des voies de signalisation responsables du caractère invasif des cellules cancéreuses dans leur microenvironnement (prolifération, migration, invasion, angiogenèse). La périostine a été démontrée essentielle dans l'établissement des métastases indiquant une avancée importante dans la compréhension de la colonisation métastatique des tissus sains. Les effets des phytochimiques sur l'expression de la périostine et sur ses actions demeurent cependant inconnus.

2.2 Hypothèse de travail

En s'appuyant sur le fait que les anthocyanidines ont des effets antiangiogéniques (Lamy, S. et al., 2006; 2008) et que ces molécules peuvent traverser la BHE (Youdim, K.A. et al., 2004), nous émettons l'hypothèse que les cinq principales

anthocyanidines des petits fruits telles que la delphinidine (Dp), la pélagonidine (Pg), la pétunidine (Pt), la cyanidine (Cy) et la malvidine (Mv) ont le potentiel d'inhiber l'action proangiogénique de la périostine sur des cellules endothéliales microvasculaires du cerveau.

2.3 Objectifs de recherche

Cette étude vise à évaluer le potentiel inhibiteur des principaux anthocyanidines des petits fruits sur l'action proangiogénique de la périostine (expression, sécrétion et fonction) *in vitro* dans les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (HBMEC) en conditions normoxiques (20% O₂) ou hypoxiques (<2% O₂) afin de reproduire les tensions faibles d'oxygène caractérisant le centre des tumeurs solides. Les principaux objectifs sont :

1. déterminer le niveau d'expression protéique et de sécrétion de la périostine dans diverses lignées cellulaires endothéliales humaines (les cellules endothéliales microvasculaires humaines, les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine et les cellules endothéliales microvasculaires du derme);
2. d'étudier l'effet des anthocyanidines sur le niveau d'expression protéique et de sécrétion de la périostine sur les HBMEC;
3. de déterminer l'effet des anthocyanidines sur le potentiel migratoire des HBMEC en présence de périostine recombinante;
4. de caractériser les effets inhibiteurs observés sur la migration en examinant les voies de signalisation impliquées dans ce processus cellulaire et affectées par les anthocyanidines;
5. d'identifier les intégrines potentiellement impliquées dans l'action de la périostine et affectées par les anthocyanidines.

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Matériels

La périostine recombinante humaine (rhPeriostin/OSF-2, cat# 3548-F2) a été fournie par R&D Systems (Minneapolis, MN) et les anthocyanidines Dp (delphinidin chloride, cat# 0904 S), Pg (pelargonidin chloride cat# 0912 S), Pt (petunidin chloride cat# 0942), Cy (cyanidin chloride cat# 0909 S) et Mv (malvidin chloride cat# 0913 S) par Extrasynthèse (Lyon, France). Les cellules endothéliales microvasculaires humaines (HBMEC) ont été achetées de PromoCell GmbH (Heidelberg, Allemagne), les cellules endothéliales immortalisées de la veine ombilicale humaine (HUVEC) et les cellules endothéliales microvasculaires du derme (HMVEC) proviennent de Clonetics (San Diego, CA). Les milieux de culture ont été obtenus de Wisent inc. (St-Bruno, QC) et de Lonza (Walkersville, MD) et les sérums de HyClone Laboratories (Logan, UT). Les réactifs pour l'électrophorèse ont été achetés de Bio-Rad (Mississauga, ON). L'anticorps dirigé contre la périostine provient de Abcam (ab152099) (Toronto, ON), l'anticorps dirigé contre phospho-ERK (P-p44/42 MAPK, cat# 9106) est de Cell Signaling Technology (Beverly, MA), celui contre ERK (ERK 1 K-23, cat# sc-94) est de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) et celui contre β -actine (8H10D10, cat# 3700) est de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Le réactif de chimioluminescence ECL HyGLO (cat# E-2500) est de Denville Scientific Inc. (Metuchen, NJ) et le Western Lightning ECL Pro (cat# NEL122001EA) est de Perkin Elmer (Waltham, MA). Le TRIzol (cat# 15596-018) pour l'extraction d'ARN

vient de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir de la trousse high capacity cDNA reverse transcription kit de Applied Biosystems (Foster City, CA) et la taille des amplicons mesurée par électrophorèse sur gel d'agarose, alors que les niveaux d'expression génique ont été mesurés par PCR en temps réel avec le SYBR Green (cat. #172-5201) de Bio-Rad (Mississauga, ON). Tous les autres réactifs proviennent de Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

3.2 Méthodes

3.2.1 Culture cellulaire

Les cellules ont été cultivées à 37°C sous une atmosphère humide sous conditions de normoxie (~20% O₂) ou d'hypoxie (<2% O₂). Les cellules ont été maintenues dans le milieu basal EBM-2 de Lonza (Walkersville, MD) supplémenté avec 2% de sérum fœtal bovin (FBS) pour les HUVEC et 5% FBS pour les HMVEC avec un mélange de facteurs de croissance EGM-2 provenant de Lonza (Walkersville, MD). Les HBMEC ont été cultivées dans un milieu RPMI (350-107-CL) de Wisent (Burlington, ON) contenant 10% (v/v) FBS de Hyclone Laboratories (Logan, UT), 10% (v/v) Nu-Sérum de BD Bioscience (Mountain View, CA), 100 unités/ml de PenStrep (cat# 450-202) de Wisent, et un supplément de croissance de cellules endothéliales (30 µg/ml) de Millipore (Temecula, CA). Les passages de 3 à 7 ont été utilisés dans cette étude pour les 3 lignées cellulaires endothéliales. Les cellules ont été traitées avec les anthocyanidines et/ou stimulées avec la périostine recombinante ou tout simplement mise dans un milieu de culture sans sérum.

3.2.2 Traitement, récolte et lyse cellulaire

Suite à une exposition des cellules en conditions de normoxie ou d'hypoxie pendant 24h, les cellules ont été prétraitées avec les anthocyanidines ou simplement sevrées dans un milieu sans sérum pendant 48h en conditions de normoxie ou d'hypoxie. Pour étudier la signalisation cellulaire de la périostine, après 48h de prétraitement, les cellules ont été stimulées avec la périostine recombinante (100 ng/ml) pendant 2 minutes. Après les traitements, le milieu de culture conditionné a été récolté et centrifugé à 1000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les cellules ont été ensuite lavées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) froid (pH 7.4) contenant 1 mM de NaF et 1 mM de Na_3VO_4 et incubées dans la même solution pendant 15 minutes sur glace. Les cellules ont été récoltées à l'aide d'un policeman et lysées dans un tampon de lyse [NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NP-40 0,05% et Triton X-100 1%] pendant 30 minutes. Les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.

3.2.3 Dosage des protéines selon la méthode microBCA

Les protéines des lysats ont été quantifiées par la méthode microBCA selon les directives du fournisseur (Pierce). Chaque expérience a été effectuée en triplicata. Une courbe standard a été effectuée avec différentes concentrations d'albumine sérique bovine (BSA). Un volume de 150 μl pour chaque échantillon ou solution standard combinés à 150 μl de réactif microBCA a été ajouté dans une plaque de 96 puits et incubée pendant 2h à 37°C à l'obscurité. Le produit coloré a été lu à une longueur d'onde de 562 nm.

3.2.4 Analyse par immunobuvardage

Une quantité égale de protéine de chaque échantillon a été solubilisée dans un tampon réducteur [Tris-HCl (pH 6.8) 62,5 mM, glycérol 10%, SDS 2%, β -mercaptoéthanol 5% et bleu de bromophénol 0,00625%], bouilli à 95°C pendant 4 minutes et les protéines ont été séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel polyacrylamide dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE). Suite à l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) avec le *Trans-Blot Turbo RTA transfer kit* de Bio-Rad. La membrane de PVDF a ensuite été bloquée pendant 1h à température pièce avec 5% de lait écrémé en poudre dans une solution saline Tris/Tween 20 (TBS-T; 147 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 et 0,1% Tween 20). Les membranes ont été lavées successivement 3 fois pendant 15 minutes dans le TBS-T et incubées avec l'anticorps primaire dans la solution TBS-T 0,1% contenant 3% de BSA et 0,01% de NaN_3 à 4°C pendant toute la nuit, et cette étape a été suivie d'une autre série de lavages dans le TBS-T à température pièce. Les anticorps primaires ont été utilisés aux dilutions indiqués selon la feuille d'information du fournisseur. Ensuite, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire respectif conjugué à la peroxydase anti-souris ou anti-lapin de Jackson ImmunoResearch (Baltimore, PA) diluée à 1/5000 dans la solution TBS-T contenant 5% lait écrémé en poudre durant 1h à température pièce. La détection des protéines d'intérêt a été visualisée avec le ECL HyGLO ou le ECL Pro sur un film d'autoradiographie. Les bandes ont été quantifiées avec le logiciel ImageJ (National Institute of Health).

3.2.5 Extraction d'ARN, synthèse d'ADNc et PCR en temps réel

Suite à une exposition des cellules en conditions de normoxie ou d'hypoxie pendant 24h, les cellules ont été prétraitées avec les différentes anthocyanidines à 35 μ M ou simplement sevrées dans un milieu sans sérum pendant 48h toujours en conditions de normoxie ou d'hypoxie. L'ARN total a été extrait des cellules avec 1 ml TRIzol. Par la suite, 200 μ l de chloroforme ont été ajoutés, suivi d'une agitation vigoureuse de 15 secondes et le mélange a été incubé à température pièce pendant 3 minutes. Une centrifugation à 11 750 g à 4°C pendant 15 minutes a été effectuée et la phase supérieure a été récupérée. Un volume de 500 μ l d'isopropanol a été ajouté et le tout a été mélangé par inversion et incubé à température pièce pendant 10 minutes. Une centrifugation de 10 minutes à 11 750g à 4°C a suivi, le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé avec 1 ml d'éthanol 75%. Le tout a été centrifugé pendant 5 minutes à 6, 610 g à 4°C et l'ARN a été dissout dans 20 μ l d'eau RNase free. L'ARN obtenu a été quantifié par absorbance à une longueur d'onde de 260 nm. Les échantillons ont été congelés à -80°C jusqu'à utilisation. Une quantité de 1 μ g d'ADN total a été utilisée pour la synthèse d'ADNc par transcription inverse (RT) avec la trousse *high capacity cDNA reverse transcription* de Applied Biosystems (Foster City, CA). Le programme qui a été utilisé pour la RT est le suivant : 25°C pendant 10 min, 37°C pendant 120 min et 85°C pendant 5 min. L'expression génique a été quantifiée par PCR en temps réel (qPCR) en utilisant le mix SYBR Green (cat# 172-5201) de Bio-Rad (Hercules, CA). Les amorces utilisées Glut1 (SLC2A1, cat#QT00068957) proviennent de Qiagen. Les amorces de la périostine (hPerio-S, cat# 15612-UO4FSF4) pour l'amorce sens et (hPerio-AS1, cat# A15612-UO5OQMC) pour l'amorce anti-sens ont été synthétisées par Invitrogen (Burlington, ON). Le programme utilisé pour la qPCR : 95°C pendant 3 min, 39 cycles de 95°C pendant 10 sec suivi de 55°C pendant 30 sec; 95°C durant 10 sec; 65°C durant 5 sec et 95°C pendant 5 sec. L'amplification des ADNc a été mesurée par fluorescence en utilisant

le Icycler de Bio-Rad (Hercules, CA). La quantité relative de l'ARNm du gène cible par rapport au contrôle interne (18S et 28S) a été calculée par la méthode ΔC_T et exprimée en unités relatives par le logiciel iQ5 Optical System Software version 2.0 de Bio-Rad (Hercules, CA).

3.2.6 Analyse de cytotoxicité par cytométrie en flux

Les cellules adhérentes et en suspension ont été récoltées avec la trypsine et recueillies dans une suspension cellulaire. Les cellules ont été centrifugées à 1000 rpm pendant 2 minutes et lavées au PBS 1X. Ensuite, 10^5 cellules ont été mises en suspension dans 100 μ l dans une solution tampon (PBS). Les cellules ont été colorées à l'iodure de propidium (IP) de Sigma-Aldrich (Oakville, ON) et incubées pendant 1 minute à l'obscurité selon le protocole du fournisseur BD Biosciences (Mississauga, ON). La lecture a été faite avec le cytomètre de flux Accuri C6 de BD Biosciences (Mountain View, CA). Les cellules en apoptose tardive ont été colorées au IP ainsi que les cellules en nécrose puisqu'elles ont perdu l'intégrité de leurs membranes plasmique permettant l'intégration de l'IP. L'acquisition et l'analyse des données ont été effectuées avec le programme *BD Accuri C6 software*.

3.2.7 Migration cellulaire avec le système d'analyse xCELLigence

Les expériences ont été réalisées avec les plaques CIM 16 (Roche Diagnostics, QC), le Real-Time Cell Analyzer (RTCA) et l'instrument xCELLigence Biosensor (Roche Diagnostics, QC). Le système a été utilisé selon les instructions du fournisseur. Les HBMEC ont été préalablement sevrées durant 24h sous conditions de normoxie (20% O_2) ou d'hypoxie (2% O_2) et ensuite traitées avec le véhicule (EtOH) ou les

anthocyanidines à 35 μ M pendant 48h sous les mêmes conditions. Les plaques CIM possèdent une chambre supérieure contenant une membrane microporeuse en polyéthylène téréphtalate (PET) avec des électrodes en or qui fournit une mesure de la migration cellulaire en temps réel par impédance électrique et une chambre inférieure servant de réservoir pour le chimioattractant. Les puits de la chambre supérieure ont une taille de 8 μ m et ont été revêtus d'une couche de 25 μ l de gélatine (0.15%/PBS) et incubés pendant 1h à 37°C. Les concentrations optimales d'ensemencement des cellules et de la périostine recombinante pour la migration cellulaire ont été déterminées. Les cellules ont étéensemencées à 10 000 cellules par puits dans 200 μ l de milieu sans sérum dans les plaques CIM. Après 30 minutes d'adhérence des cellules à la membrane, l'impédance électrique a été mesurée par l'instrument RTCA DP aux 5 minutes pendant 24h à 37°C sous condition de normoxie. Cette mesure est exprimée en unités arbitraires et nommée indice cellulaire. Chaque expérience a été effectuée en duplicata.

3.2.8 Méthode de transfection pour les petits ARN interférents

Les cellules HBMEC ont été transfectées sous conditions de normoxie ou d'hypoxie avec 100 nM de chaque siRNA (*small interfering RNA*) dirigé contre 6 différentes intégrines: ITG α v (cat# S100034342), ITG α 5 (cat# S102654541), ITG α 6 (cat# S102654078), ITG β 1 (cat# S100300573), ITG β 3 (cat# S100004585), ITG β 5 (cat# S102780617) ou avec des séquences aléatoires (ALLStar Negative Control siRNA, cat# 1027281) pendant 24h en conditions de normoxie ou d'hypoxie en utilisant l'agent de transfection Lipofectamine 2000 (cat# 11668) suivant le protocole de Invitrogen.

2.2.9 Analyses statistiques

Les données sont représentatives de deux ou plusieurs expériences indépendantes. Les statistiques significatives ont été évaluées par one-way ANOVA avec le test Dunnett pour comparer deux ou plusieurs groupes au contrôle. Pour comparer deux ou plusieurs courbes (groupe contrôle vs groupe traité aux anthocyanidines), le test Tukey a été utilisé. Les différences ont été considérées significatives avec une valeur de $P < 0,05$.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

4.1 Expression et sécrétion de la périostine dans trois modèles cellulaires endothéliaux; HBMEC, HMVEC et HUVEC

Afin de choisir le meilleur modèle cellulaire, nous avons procédé à une analyse *in vitro* du contenu protéique en périostine dans les lysats et le milieu conditionné de trois lignées cellulaires endothéliales (HBMEC, HMVEC et HUVEC) par SDS-PAGE en conditions dénaturantes (Figure 4.1 A). Puisque les cellules cancéreuses au centre des tumeurs solides ont un taux faible en oxygène favorisant l'angiogenèse pour leur croissance (Yang et al., 2013), nous avons exposé des cellules endothéliales dans une chambre hypoxique à 2% d'O₂ (condition hypoxique) et d'autres à 20% d'O₂ (condition normoxique). Dans ces conditions, l'expression protéique de la périostine observée sur l'autoradiogramme démontre que la protéine est bel et bien exprimée dans les HBMEC et les HMVEC avec un poids moléculaire d'environ 93 kDa, mais ne l'est pas dans les HUVEC. De plus, les analyses de type western nous ont permis d'observer la présence de deux bandes immunoréactives représentant possiblement les formes matures et tronquées de la périostine surtout exprimées dans les HMVEC. Il est aussi intéressant de remarquer que la périostine est fortement sécrétée en condition d'hypoxie comparée en normoxie dans les milieux conditionnés. Et inversement, on retrouve la protéine en abondance en normoxie comparativement en hypoxie dans les lysats des cellules (Figure 4.1A).

À première vue, les HBMEC sécrètent la périostine plus fortement que les deux autres lignées. Compte tenu du fait que chaque lignée cellulaire endothéliale ne possède pas la même vitesse de division cellulaire, densité d'ensemencement ainsi que le pourcentage de viabilité, un compte cellulaire a été pris en considération au cours de l'expérience de comparaison entre les trois lignées cellulaires. La Figure 4.1B présente les résultats obtenus des quantifications par rapport au nombre de cellules. On remarque que la sécrétion de la périostine dans les surnageants est semblable dans les HBMEC et les HMVEC en condition de normoxie. Cependant, à 24h sous condition d'hypoxie, les HBMEC sécrètent 2 fois plus de périostine qu'en normoxie tandis que les HMVEC ne démontrent aucune surexpression en hypoxie comparativement à la normoxie. La tendance se maintient également dans les HBMEC avec 48h d'exposition à l'hypoxie. Dans les lysats, l'expression protéique la plus importante est mesurée dans les HMVEC à 24h d'exposition en normoxie et hypoxie.

La PCR en temps réel est un type d'analyse dotée d'une grande sensibilité et spécificité en quantifiant dans le temps les produits d'amplification de la réaction à chaque cycle. La PCR en temps réel normalise l'expression d'un gène d'intérêt par rapport à celle d'un gène de standardisation auquel son expression n'est pas modulée par les conditions expérimentales. Pour confirmer que les cellules étaient bel et bien en condition d'hypoxie, nous avons vérifié l'expression génique par PCR en temps réel de deux marqueurs hypoxiques des cellules soumises à l'hypoxie comparée à ceux en normoxie. Plusieurs travaux ont démontré que le VEGF et le Glut1 sont augmentés en hypoxie (Takagi et al. 1998; Lum et al. 2007; Zheng, 2012). Comme le démontre la Figure 1C, toutes les trois lignées endothéliales possèdent une expression génique des deux marqueurs hypoxiques VEGF et Glut1 d'au moins 2 fois plus élevée en hypoxie qu'en normoxie. Ces résultats confirment et démontrent que les cellules ont été soumises aux conditions d'hypoxie.

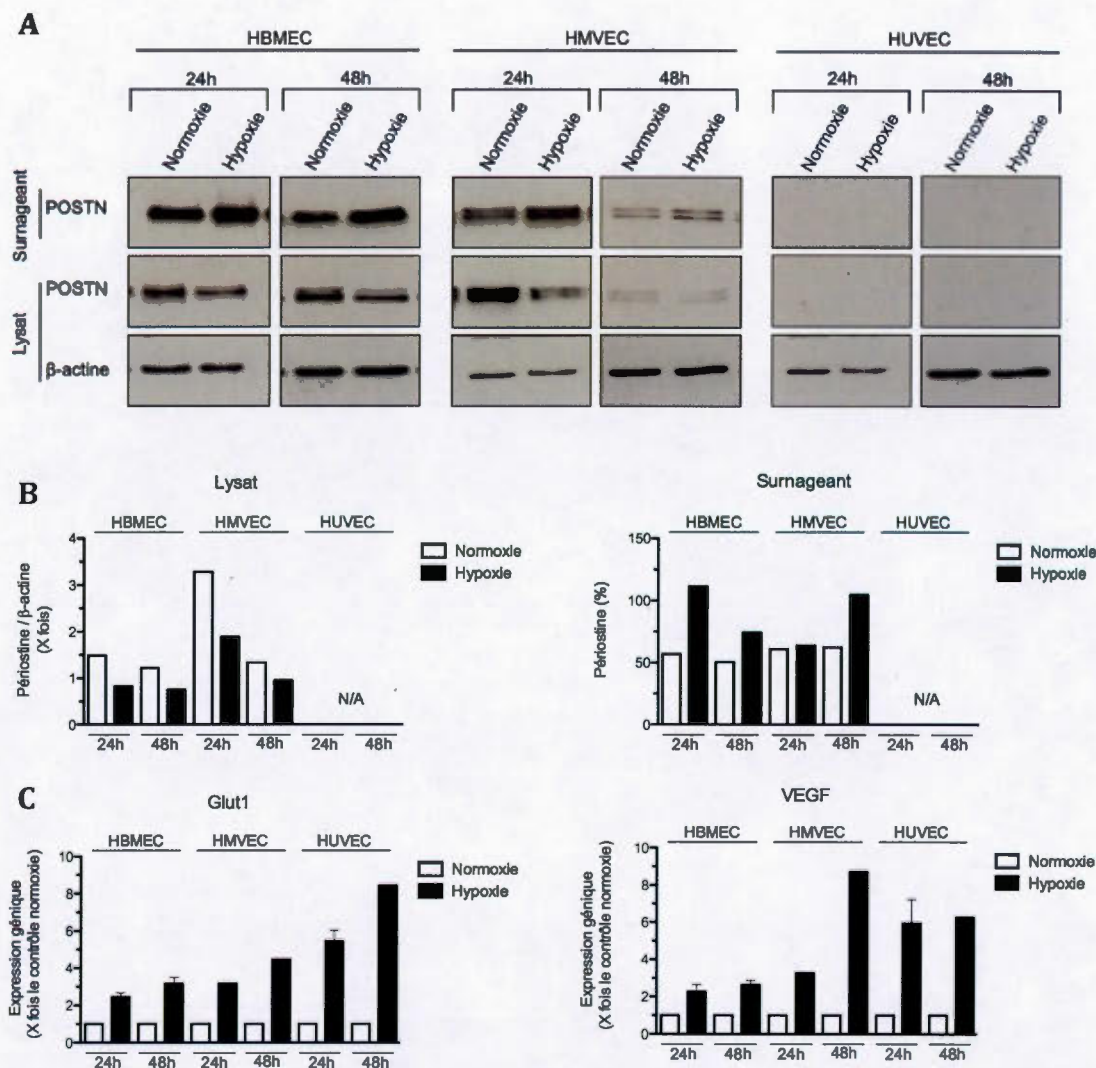


Figure 4.1 : Niveaux d'expression protéique et de sécrétion de la périostine dans les lignées cellulaires endothéliales humaines HBMEC, HMVEC et HUVEC. (A) Les cellules ont été sevrées dans un milieu sans sérum pendant 24h ou 48h exposées sous conditions de normoxie (20% O_2) ou d'hypoxie (<2% O_2). Les cellules ont été lysées et l'expression et la sécrétion protéique de la périostine au niveau basal a été monitoré par immunobuvardage. **(B)** Représentation graphique de l'intensité des bandes analysée par densitométrie et exprimée en unités arbitraires en utilisant le programme ImageJ. Chaque condition a été normalisée par rapport au contrôle désigné. Les résultats sont exprimés en pourcentages du niveau basal pour les surnageants et en X fois du niveau basal pour les lysats. **(C)** L'ARN total a été extrait des lysats et une PCR en temps réel a été effectuée pour évaluer le niveau d'expression génique des marqueurs hypoxiques Glut1 et VEGF. Les valeurs obtenues représentent la moyenne \pm SEM des résultats de quatre expériences indépendantes pour les HBMEC et de deux expériences indépendantes pour les HUVEC à 24h. Les résultats sont exprimés en X fois le contrôle normoxie.

Puisque la périostine est fortement exprimée et sécrétée dans les HBMEC, que les tendances se reproduisent au temps de 24h et 48h, et que ces cellules possèdent une vitesse de division plus rapide ainsi qu'une plus grande densité d'ensemencement, nous avons choisi les HBMEC comme modèle cellulaire. De plus, étant donné que l'expression génique des marqueurs hypoxiques est plus élevée à 48h qu'à 24h, nous avons poursuivi avec un temps de sevrage de 48h pour les expériences avec les anthocyanidines.

4.2 Effet des anthocyanidines sur l'expression et la sécrétion de la périostine dans les HBMEC

Afin d'évaluer l'efficacité des anthocyanidines à affecter le potentiel angiogénique de la périostine, nous avons observé dans un premier temps, l'effet de cinq anthocyanidines sur le niveau d'expression protéique de la périostine au niveau basal par immunobuvardage (Figure 4.2A). Un prétraitement avec les cinq anthocyanidines à une concentration de 25 μ M pendant 48h a été réalisé en condition de normoxie (20% O₂) et d'hypoxie (<2% O₂). Une concentration de 25 μ M a été choisie en se basant sur les résultats de Lamy et al. 2006. D'après les résultats, tous semblent démontré une diminution de l'expression de la périostine dans les lysats en normoxie. La delphinidine possède le potentiel inhibiteur le plus fort avec un pourcentage d'inhibition de 90 à 95% en normoxie ainsi qu'en hypoxie. La pétunidine a aussi démontré un fort potentiel inhibiteur de 80%, mais seulement en normoxie. On constate également que la cyanidine a non seulement inhibé l'expression protéique en normoxie, mais aussi en hypoxie avec des pourcentages d'inhibition de 40 et 20% respectivement (Figure 4.2B). Ces résultats démontrent que toutes les anthocyanidines ont un effet inhibiteur sur l'expression de la périostine en condition de normoxie. Il est intéressant de remarquer que cet effet inhibiteur est toujours

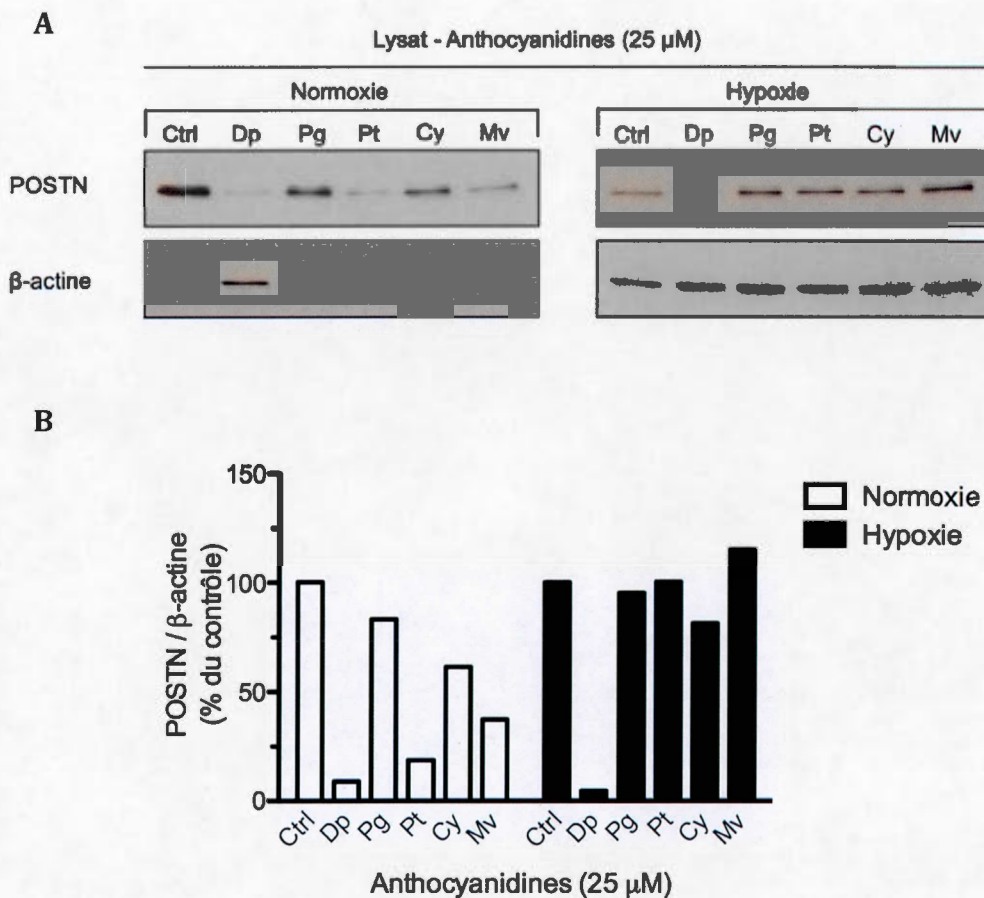


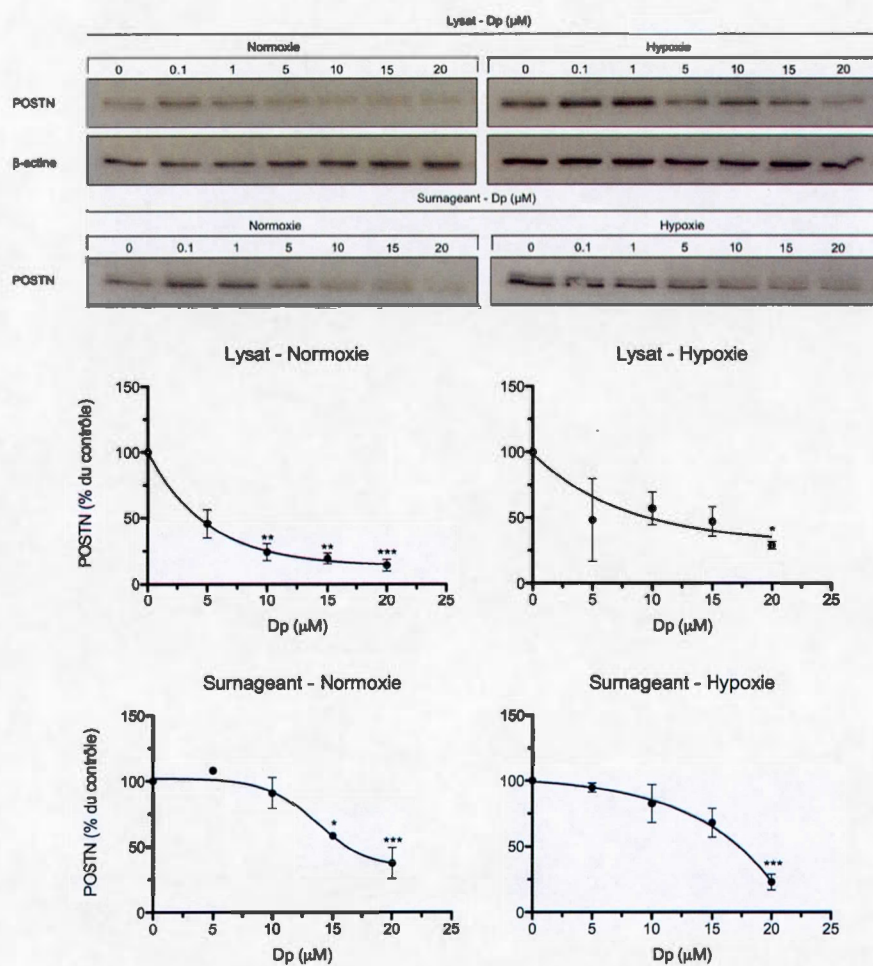
Figure 4.2 : Inhibition par les anthocyanidines de l'expression protéique de la périostine au niveau basal dans les HBMECs (A) Les HBMECs ont été prétraitées en présence des anthocyanidines à 25 μ M ou non dans un milieu sans sérum pendant 48h sous conditions de normoxie (20% O₂) ou d'hypoxie (<2% O₂). Les HBMECs ont été lysées et l'expression protéique de la périostine au niveau basal a été monitoré par immunobuvardage. (B) L'intensité des bandes a été analysée par densitométrie utilisant le programme ImageJ et exprimée en unités arbitraires représentées dans un graphique. Chaque condition a été normalisée par rapport à la β -actine. Les résultats sont exprimés en pourcentages des contrôles normoxie et hypoxie.

observé pour certaines anthocyanidines en hypoxie. Cette expérience devra être confirmée puisqu'elle n'a été effectuée qu'une fois.

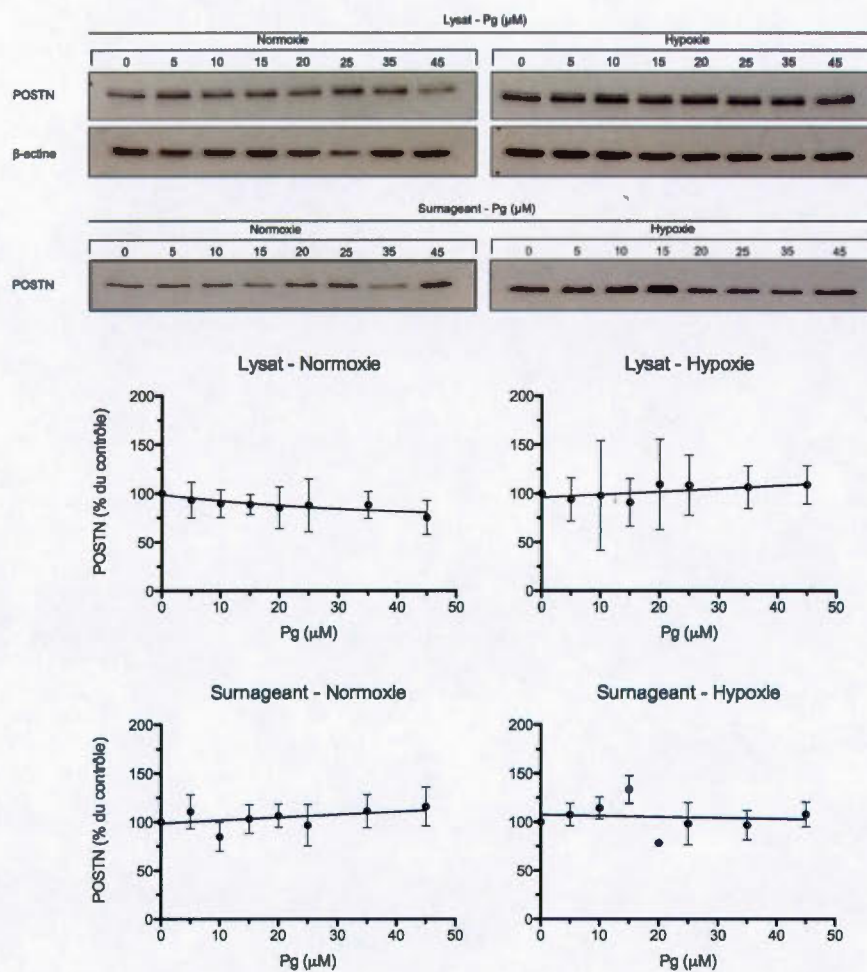
4.3 Effet des anthocyanidines sur l'expression et la sécrétion de la périostine en fonction de la concentration

Dans le but de déterminer la concentration requise pour obtenir 50% d'inhibition de l'expression de la périostine (IC_{50}), nous avons analysé l'effet inhibiteur à diverses concentrations d'anthocyanidines. On observe d'abord que les effets obtenus sont dépendants de la concentration des anthocyanidines étudiées (Figure 4.3). Les résultats nous indiquent que la delphinidine, pétunidine, cyanidine et malvidine ont significativement inhibé l'expression de la périostine dans les lysats en condition normoxique (Figure 4.3A, C, D et E). En condition hypoxique, les anthocyanidines delphinidine et cyanidine sont toujours capables d'inhiber significativement l'expression de la périostine de façon concentration-dépendante dans les lysats. On remarque ensuite que les anthocyanidines possèdent toutes des valeurs d' IC_{50} différentes. Comme démontré à la Figure 4.3A et dans le Tableau 4.1, la delphinidine indique une inhibition plus importante avec des IC_{50} aux concentrations de 3,4 μM en normoxie et de 4,9 μM en hypoxie. Les valeurs d' IC_{50} obtenues en condition normoxique pour la malvidine, la pétunidine et la cyanidine sont plus élevées avec des concentrations de 8,2; 12 et 17 μM respectivement. En condition hypoxique, les valeurs sont de 15,2 et 22,5 μM pour la cyanidine et la pétunidine. La pélagonidine ne démontre aucun effet significatif sur l'expression de la périostine dans les lysats cellulaires provenant des deux conditions alors que la malvidine ne semble avoir des effets inhibiteurs significatifs qu'en normoxie.

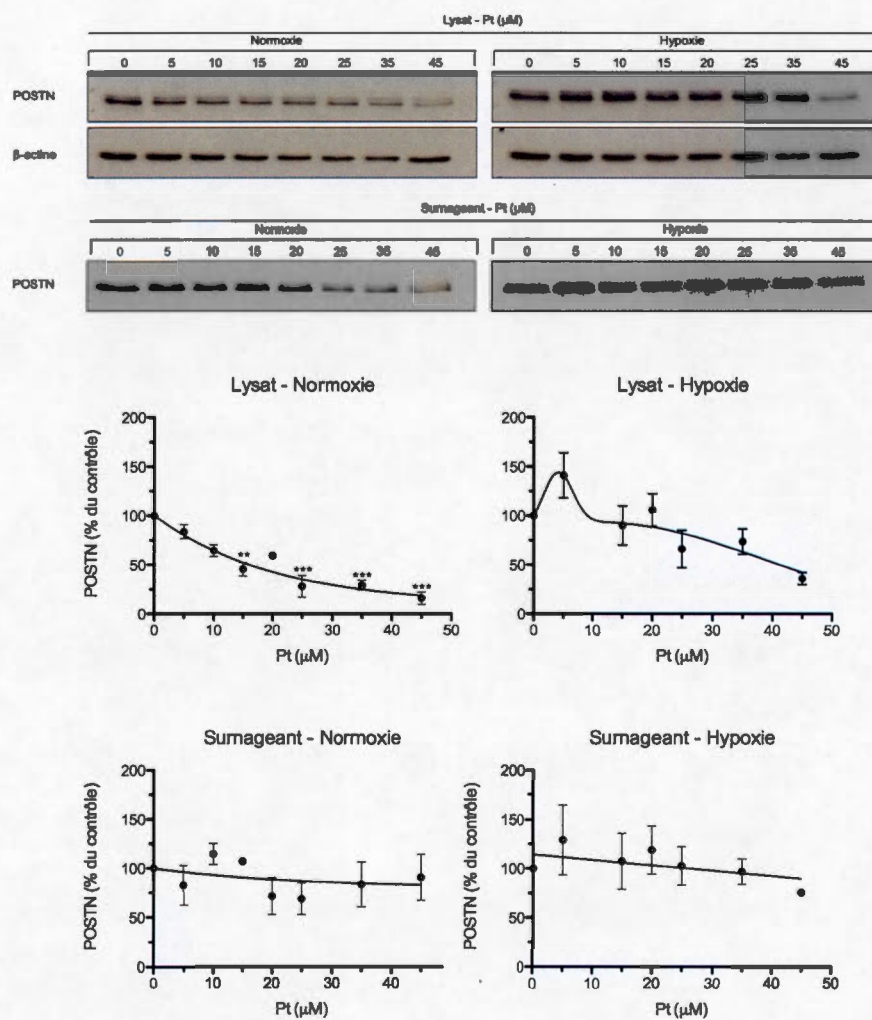
A



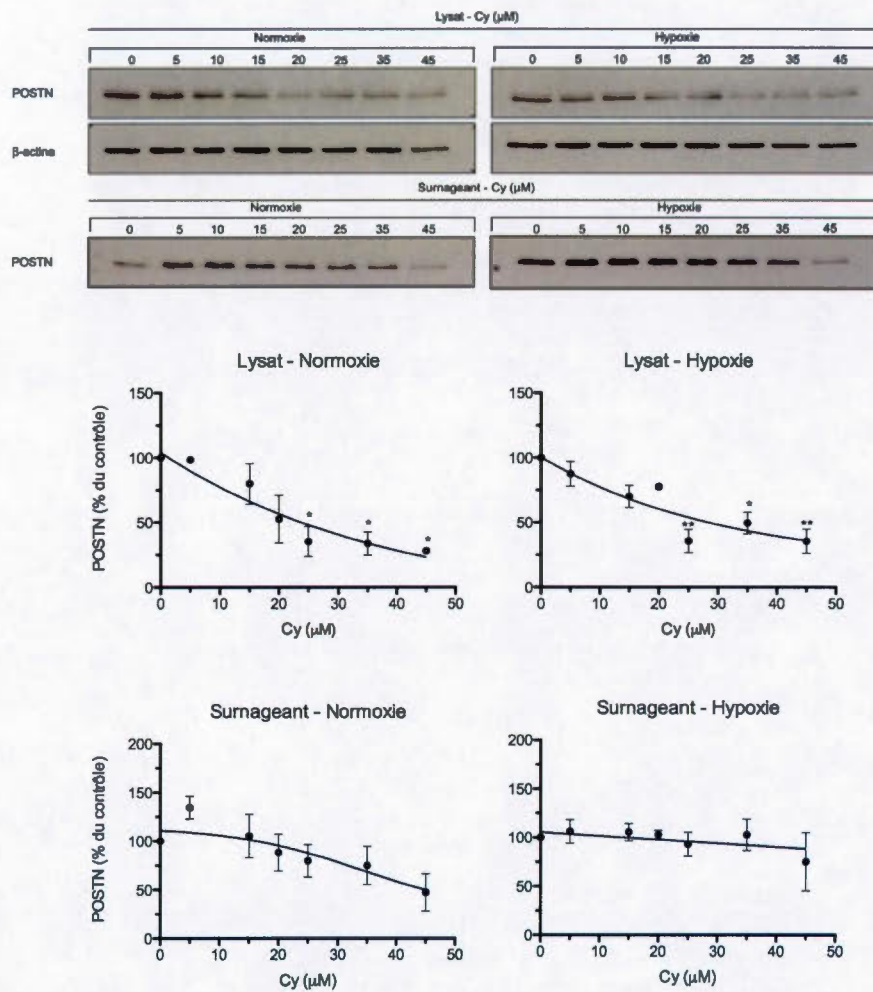
B



C



D



E

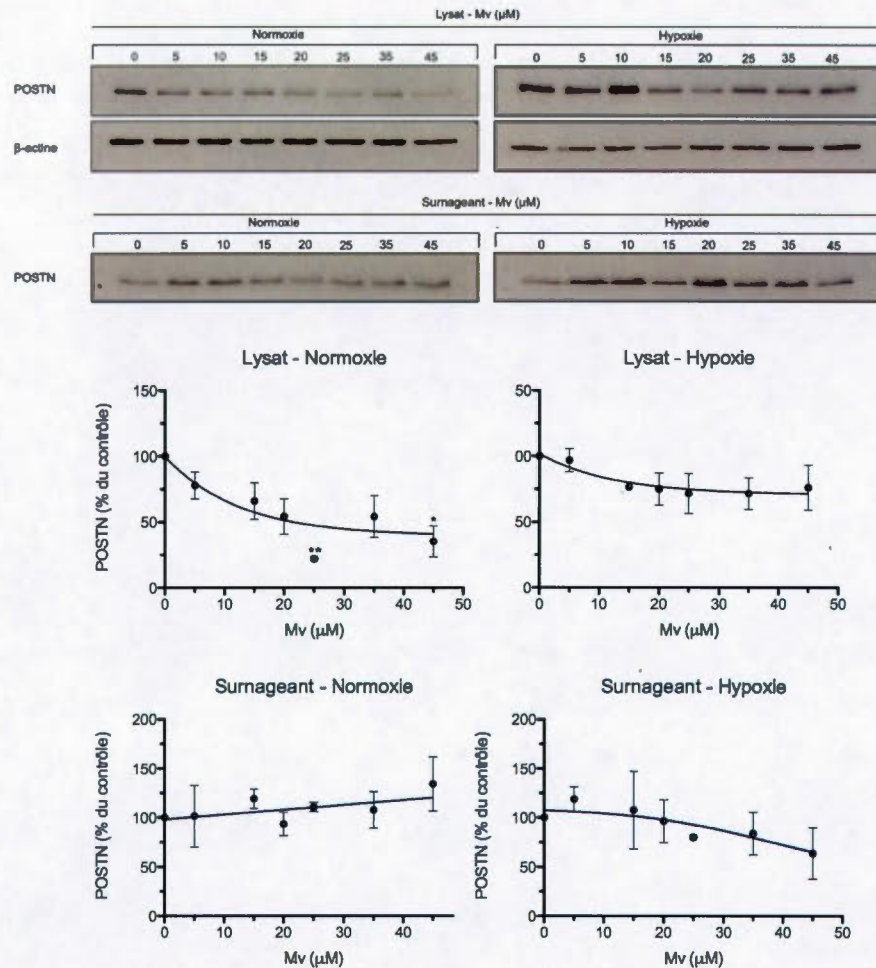


Figure 4.3 : Les anthocyanidines inhibent l'expression et la sécrétion protéique de la périostine basale dans les HBMECs. Les HBMECs ont été prétraitées en présence de la (A) Dp, (B) Pg, (C) Pt, (D) Cy, et (E) Mv de façon dose-dépendante aux concentrations indiquées pendant 48h exposées en conditions de normoxie (20% O₂) ou d'hypoxie (<2% O₂). Les HBMECs ont été lysées et l'expression et la sécrétion protéique de la périostine au niveau basal a été monitoré par immunobuvardage. Les immunobuvardages sont les figures représentatives. L'intensité des bandes a été analysée par densitométrie et la moyenne SEM de deux à six expériences indépendantes selon la concentration est représentée dans un graphique. Un one-way Anova avec le test Dunnett a été effectué, (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001) étant considérés statistiquement significatif par rapport au contrôle. Chaque condition a été normalisée par rapport au contrôle désigné. Les résultats sont exprimés en pourcentages des contrôles normoxie ou hypoxie.

Tableau 4.1 : Valeur des IC_{50} des anthocyanidines sur l'expression protéique de la périostine dans les lysats des HBMEC.

	IC_{50} (μM)				
	Anthocyanidines				
	Dp	Pg	Pt	Cy	Mv
Normoxie	3,4	n/a	12	17	8,2
Hypoxie	4,9	n/a	22,5	15,2	n/a

Note: Les IC_{50} sont définis comme étant la concentration (μM) à laquelle les anthocyanidines inhibent à 50% l'expression protéique de la périostine dans les lysats des HBMEC. La valeur des IC_{50} a été calculée avec les courbes des dose-réponses de chaque condition. Les valeurs obtenues représentent deux à cinq expériences indépendantes selon la concentration des anthocyanidines. n/a, non approprié.

Le milieu conditionné des HBMEC traitées avec chaque anthocyanidine a également été analysé pour déterminer le niveau de périostine sécrété. Cependant, les anthocyanidines démontrent un plus grand potentiel inhibiteur au niveau de l'expression protéique de la périostine que sur la sécrétion de celle-ci. Dans l'ensemble, les anthocyanidines n'ont démontré aucune inhibition significative de la sécrétion de la périostine excepté pour la delphinidine avec des indices IC_{50} de 13,6 et 15,9 μ M pour la normoxie et hypoxie, respectivement. Celle-ci démontre encore une fois un potentiel d'inhibition plus important en normoxie ainsi qu'en hypoxie (Figure 4.3A).

4.4 Effet des anthocyanidines sur la viabilité cellulaire des HBMEC

Dans toute culture de cellules, il est tout à fait normal d'observer un niveau basal de mortalité cellulaire. Toutefois, il est primordial de s'assurer que les effets d'inhibition de la périostine ne sont pas dus à une cytotoxicité des anthocyanidines. La viabilité cellulaire des anthocyanidines dans les HBMEC a donc été évaluée par cytométrie en flux avec l'IP. Pour ce faire, les HBMEC ont été prétraitées pendant 48h avec chacune des anthocyanidines avec la plus forte concentration utilisée dans les expériences soit de 45 μ M. Les cellules adhérentes aux pétris ont été récoltées par trypsination puis combinées aux cellules en suspension pour ensuite être colorées avec IP. L'incorporation de l'IP par les cellules a été mesurée au cytomètre en flux. Des graphiques ont été obtenus avec le programme *BD Accuri C6 software* indiquant le pourcentage de viabilité et de mortalité cellulaire; un histogramme récapitulatif est présenté (Figure 4.4). Dans ce graphique, on observe une légère baisse (15%) de la viabilité cellulaire des HBMEC traitées avec la delphinidine en condition d'hypoxie. Aucune cytotoxicité des cellules HBMEC traitées avec les autres anthocyanidines n'a été détectée en conditions normoxique et hypoxique. Le test par cytométrie en flux

suggère que les effets inhibiteurs observés par les anthocyanidines sur l'expression de la périostine ne sont pas attribuables à une cytotoxicité cellulaire. Pour confirmer cela, l'expérience devra être refaite pour avoir au moins trois expériences indépendantes.

4.5 Effet des anthocyanidines sur l'expression génique des intégrines

Afin de mieux cerner l'action des anthocyanidines sur la périostine, d'autres tests ont été réalisés. Sachant que la périostine est capable de transduire son signal par l'intermédiaire des intégrines, nous avons voulu, dans un premier temps, vérifier si les intégrines α_v , α_5 , α_6 , β_1 , β_3 et β_5 sont exprimées dans les HBMEC au niveau basal. Une PCR en temps réel a été effectuée démontrant la présence des amplicons générés pour toutes les intégrines dans les HBMEC (Figure 4.5A). Dans un deuxième temps, nous avons examiné si les anthocyanidines peuvent affecter le niveau d'expression des intégrines afin de mieux comprendre leur mécanisme d'action. L'ARN total a donc été extrait à partir des cellules traitées ou non avec les anthocyanidines à 35 μM et les ADNc ont été synthétisés comme décrit dans les procédures expérimentales. Les résultats à la Figure 4.5B indiquent un niveau d'expression génique affecté par la pétunidine avec un pourcentage d'inhibition de 13 à 40% en normoxie et de 23 à 40% en hypoxie pour toutes les intégrines excepté pour la β_5 en normoxie. L'intégrine la plus affectée par la pétunidine est la α_6 avec une inhibition de 40% dans les deux conditions. La delphinidine a faiblement ou presque pas affecté le niveau d'expression des intégrines en normoxie mais l'a fortement inhibé en hypoxie. La tendance se poursuit pour la pélargonidine, cyanidine et malvidine, avec une activité d'inhibition plus grande sous condition hypoxique. Ces résultats suggèrent une implication possible des intégrines dans le mécanisme d'inhibition des anthocyanidines sur la périostine dans les HBMEC.

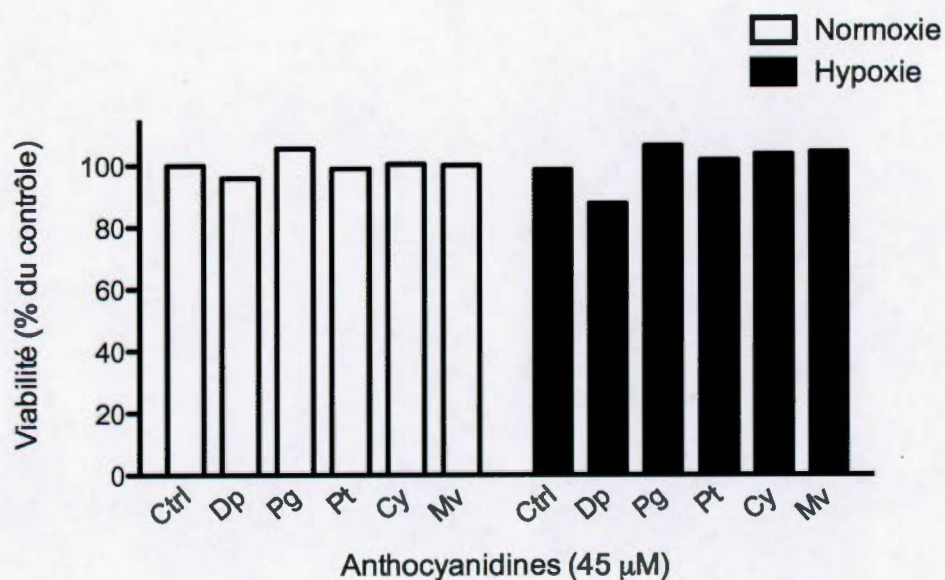
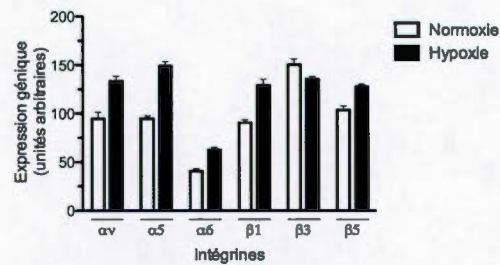


Figure 4.4 : Effet des anthocyanidines sur la viabilité des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales. Les HBMECs ont été pré-traitées en présence ou non des anthocyanidines à 45 µM pendant 48h exposées sous conditions de normoxie (20% O₂) ou d'hypoxie (<2% O₂). La viabilité cellulaire des anthocyanidines a été mesurée par cytométrie de flux (Accuri C6) avec l'iodure de propidium. Un graphique du compte cellulaire par rapport au FL3 ($\lambda = 650$ nm) indiquant la mortalité (M1) et la viabilité (M2) en pourcentage a été obtenu et le pourcentage de viabilité des cellules traitées ou non avec les anthocyanidines en conditions de normoxie ou d'hypoxie a été calculé par rapport aux contrôles normoxie et hypoxie.

A



B

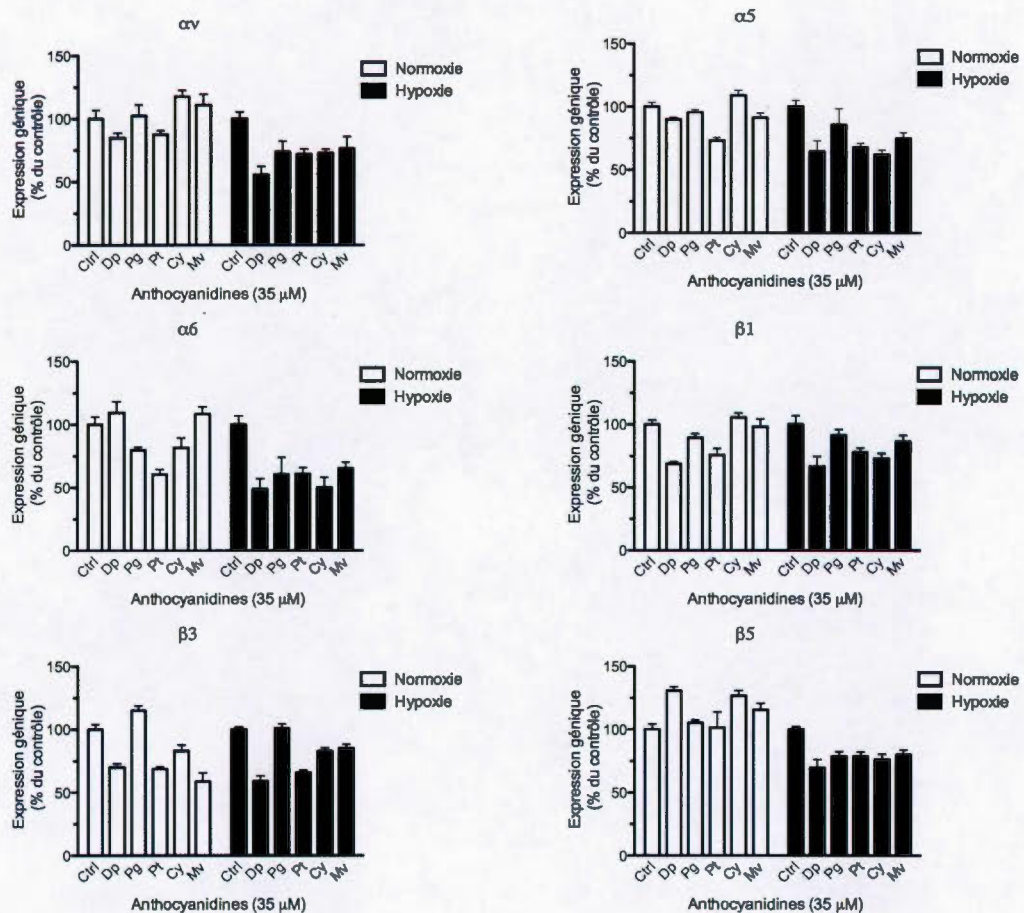


Figure 4.5 : Les intégrines αv , $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$ et $\beta 5$ sont exprimées dans les HBMEC et affectées par les anthocyanidines. Les cellules ont été pré-traitées pendant 48h (A) en absence ou (B) en présence d'anthocyanidines à 35 μ M exposées sous conditions de normoxie (20% O₂) ou d'hypoxie (<2% O₂). L'ARN total a été extrait avec le trizol et une PCR en temps réel a été effectuée comme décrit dans le matériel et méthodes avec les intégrines αv , $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$ et $\beta 5$ et les gènes de références 18S et 28S. Les résultats d'une expérience effectuée en triplicata sont exprimés en pourcentages du contrôle de normoxie ou d'hypoxie.

4.6 La périostine induit la migration des HBMEC

La périostine a été identifiée et démontrée étant un facteur important favorisant l'invasion et l'angiogenèse de différentes lignées cellulaires (Siriwardena et al., 2006; Bao et al., 2004). Puisque la migration des cellules endothéliales est une étape importante dans l'angiogenèse, permettant aux cellules de former de nouveaux microvaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, l'étape suivante consistait tout d'abord à évaluer l'efficacité de la périostine à induire la migration des HBMEC et, par conséquent, de vérifier si les anthocyanidines sont capables de l'inhiber. Pour élucider ceci, un essai de migration a été effectué à l'aide du système en temps réel xCELLigence. Les cellules HBMEC ont été mises en présence de différentes concentrations de périostine recombinante humaine dans le but de déterminer la concentration optimale induisant leur migration. Comme démontré à la Figure 4.6A, on peut confirmer que la périostine stimule la migration cellulaire des HBMEC à une concentration optimale de 100 ng/ml de périostine en conditions de culture normoxique et hypoxique.

Par la suite, pour évaluer l'efficacité des anthocyanidines à inhiber la migration cellulaire induite par la périostine, les HBMEC ont été prétraitées avec chacune des anthocyanidines à 35 μ M en normoxie ou en hypoxie pendant 48h avant d'être mises dans la plaque de migration en présence de la périostine recombinante. Une concentration de 35 μ M a été choisie puisqu'à 45 μ M, la viabilité des cellules traitées avec la delphinidine semble être faiblement affectée comme démontré à la figure 4.4. Les résultats de migration obtenus montrent que les anthocyanidines inhibent de façon significative la migration induite par la périostine recombinante sous des conditions normoxique et hypoxique. Cependant, la pélargonidine est la seule qui n'affecte pas la migration en hypoxie de façon significative (Figure 4.6B). De plus, il

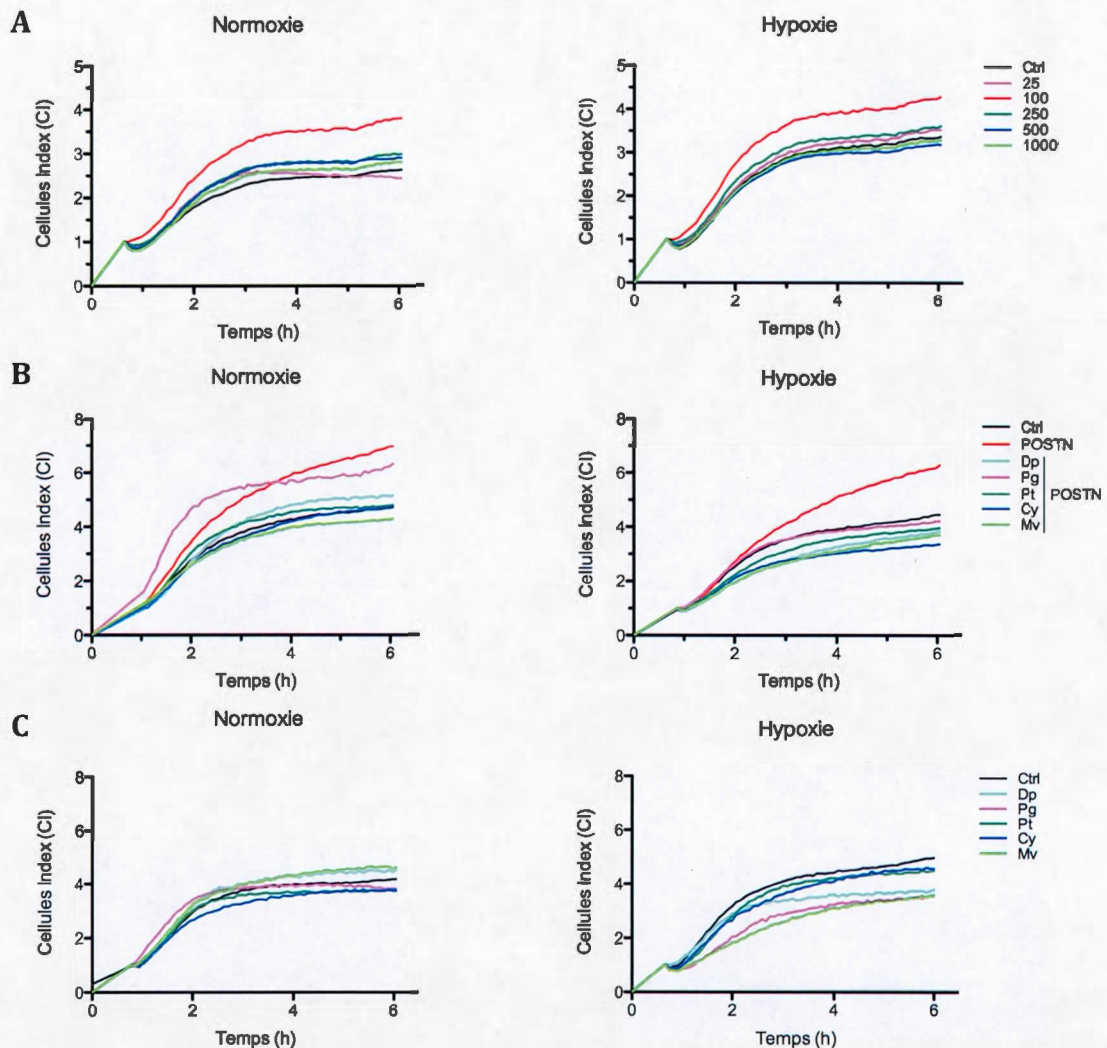


Figure 4.6 : Inhibition de la migration induite par la périostine par les anthocyanidines dans les HBMECs. Les tests de migration ont été effectués avec le système d'analyse en temps réel xCELLigence et les changements d'impédance électrique mesurés ont été normalisés à 1. **(A)** Les cellules ont été sevrées pendant 48h en normoxie ou d'hypoxie et mises en présence de différentes concentrations de périostine recombinante lors de la migration. **(B)** Les cellules ont été pré-traitées en présence des anthocyanidines à 35 μ M en normoxie ou hypoxie pendant 48h et stimulées avec la périostine recombinante à 100ng/ml lors de la migration **(C)** Les cellules ont été pré-traitées en présence des anthocyanidines à 35 μ M en normoxie ou hypoxie pendant 48h avant l'essai de migration. Une analyse one-way Anova avec le test Tukey a été effectuée indiquant *** pour Ctrl, Dp, Pt, Cy et Mv en normoxie et Ctrl, Dp, Pg, Pt, Cy et Mv en hypoxie (*** $p < 0,001$) étant considérés statistiquement significatif par rapport au contrôle stimulé par la périostine recombinante. Les résultats sont la moyenne d'une expérience effectuée en duplicata en (A) et (B) et de trois expériences indépendantes effectuée en duplicata en (C).

est intéressant de remarquer qu'en hypoxie, les anthocyanidines semblent plus efficaces à inhiber la migration induite par la périostine puisque les valeurs de leur indices CI sont plus basses que celles du contrôle tandis qu'en normoxie, les indices CI sont semblables à celles du contrôle.

Pour s'assurer que les effets inhibiteurs des anthocyanidines sur la migration des HBMEC sont spécifiques à l'action de la périostine, leur impact a été évalué sur la migration basale des HBMEC (Figure 4.6C). Ces résultats démontrent que les niveaux de migration des HBMEC sans stimulation avec la périostine recombinante et traitées avec les anthocyanidines sont presque semblables à la migration basale sous condition de normoxie. Cependant, quelques anthocyanidines telles que les delphinidine, pélargonidine et malvidine semblent affecter le niveau basal suggérant des effets sur d'autres facteurs impliqués dans la migration des HBMEC.

4.7 Impact des intégrines sur la migration induite par la périostine recombinante

Le fait que les intégrines jouent un rôle important dans la migration cellulaire (Hood and Chersesh, 2002, Nat Rev Cancer, 2(2), 91-100), nous avons voulu investiguer si les intégrines étudiées précédemment dans notre étude étaient impliquées dans la migration induite par la périostine dans les HBMEC. Pour ce faire, les cellules ont été transfectées avec différents siRNA dirigés contre les intégrines α_v , α_5 , α_6 , β_1 , β_3 et β_5 en conditions de normoxie et d'hypoxie comme décrit dans la section Matériels et méthode. Afin d'évaluer l'efficacité de répression génique dans les cellules HBMEC transfectées par les siRNA, une analyse par PCR en temps réel a été réalisée (Figure 4.7A). Les pourcentages d'efficacité de transfection pour les intégrines α_v , α_5 et β_5 sont entre 50 et 70% et pour les intégrines α_6 , β_1 et β_3 entre 74 et 90% sous des conditions normoxique et hypoxique. Cette méthode a permis de valider la

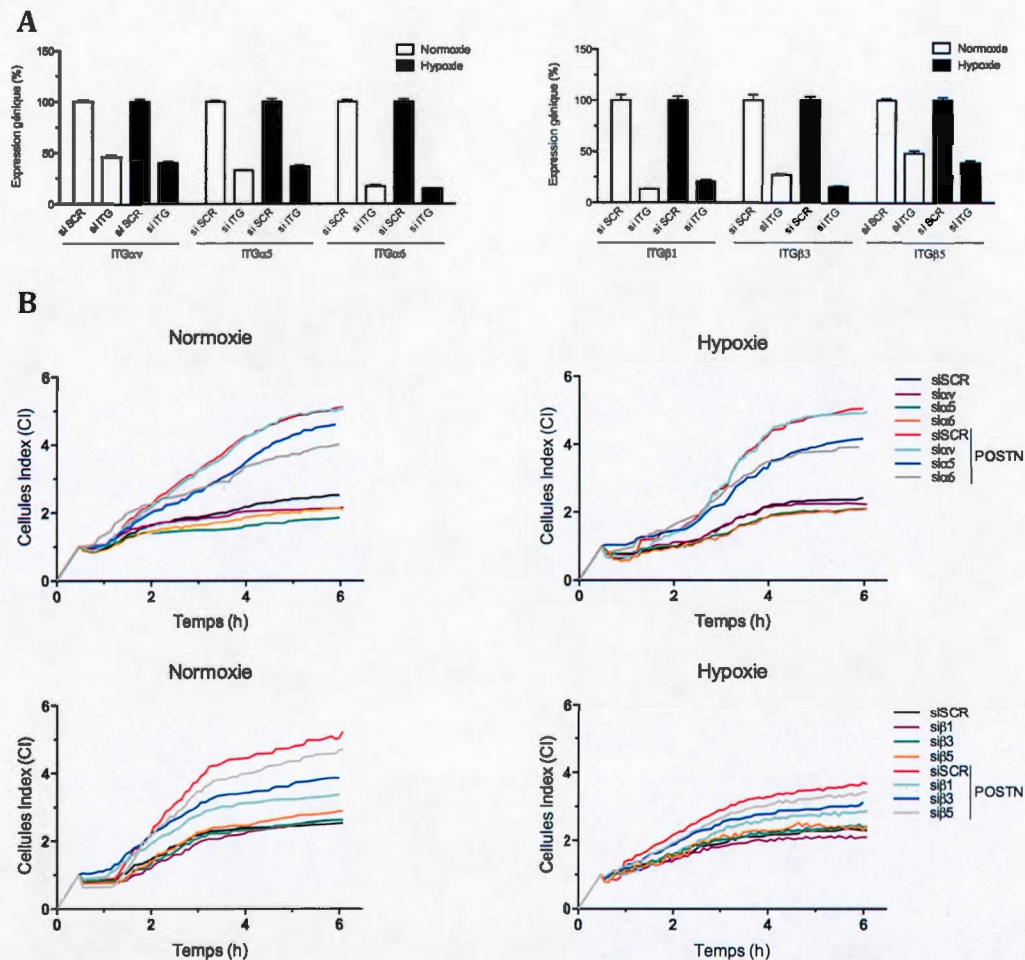


Figure 4.7 : Impact des intégrines sur la migration cellulaire des HBMECs induite par la périostine recombinante. (A) Les HBMECs ont été transfectées de manière transitoire avec des siARN contre les intégrines α v, α 5, α 6, β 1, β 3, β 5 ou une séquence scramble sous conditions de normoxie ou d'hypoxie comme décrit dans la section matériel et méthode. L'ARN total des cellules transfectées a été extrait et une PCR en temps réel a été effectuée pour chaque gène des intégrines. Les valeurs obtenues sont la moyenne \pm SEM d'une expérience effectuée en triplicata et représentée en pourcentage. (B) Un test de migration a été effectué avec les HBMECs transfectées avec ou sans stimulation par la périostine recombinante à 100ng/ml. Les valeurs obtenues sont les changements d'impédance électrique mesurés par le système d'analyse en temps réel xCELLigence et normalisés à 1 d'une expérience effectuée en duplicata.

répression génique transitoire des intégrines dans les HBMEC transfectées avec les siARN.

La migration induite par la périostine a ensuite été effectuée avec les HBMEC transfectées. Les résultats ont démontré une inhibition de la migration cellulaire induite par la périostine avec les si-intégrines $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$ et $\beta 5$ comparées au contrôle siSCR (siScrambled; Figure 4.7B). Les si-intégrines $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$ et $\beta 5$ inhibent également la migration induite par la périostine en condition d'hypoxie. Comme montré dans les graphiques de la Figure 4.7B, la migration des HBMEC transfectées avec les différents si-intégrines α en absence de périostine recombinante est affectée faiblement comparativement à la migration des cellules transfectées avec les si-intégrines β qui est aucunement inhibée.

4.8 Effet des anthocyanidines sur la phosphorylation de ERK1/2 induite par la périostine recombinante

Pour comprendre davantage les mécanismes moléculaires associés à l'action inhibitrice et antiangiogénique des anthocyanidines sur la périostine, nous avons vérifié si ces anthocyanidines affectent le niveau de phosphorylation d'une protéine impliquée, entre autres, dans la migration cellulaire (Sun et al., 2015, J Recept Signal Transduct Res, 35(6), 600-604.). L'effet de la périostine et des anthocyanidines sur la voie de signalisation ERK1/2 a été étudié par immunobuvardage de type western.

Dans un premier temps, une cinétique de temps d'activation de ERK1/2 par la périostine recombinante a été effectuée en conditions normoxique et hypoxique dans les HBMEC. La Figure 4.8A présente la mise en évidence de la phosphorylation de ERK1/2 lorsqu'on stimule les HBMEC avec 100 ng/ml de périostine recombinante à

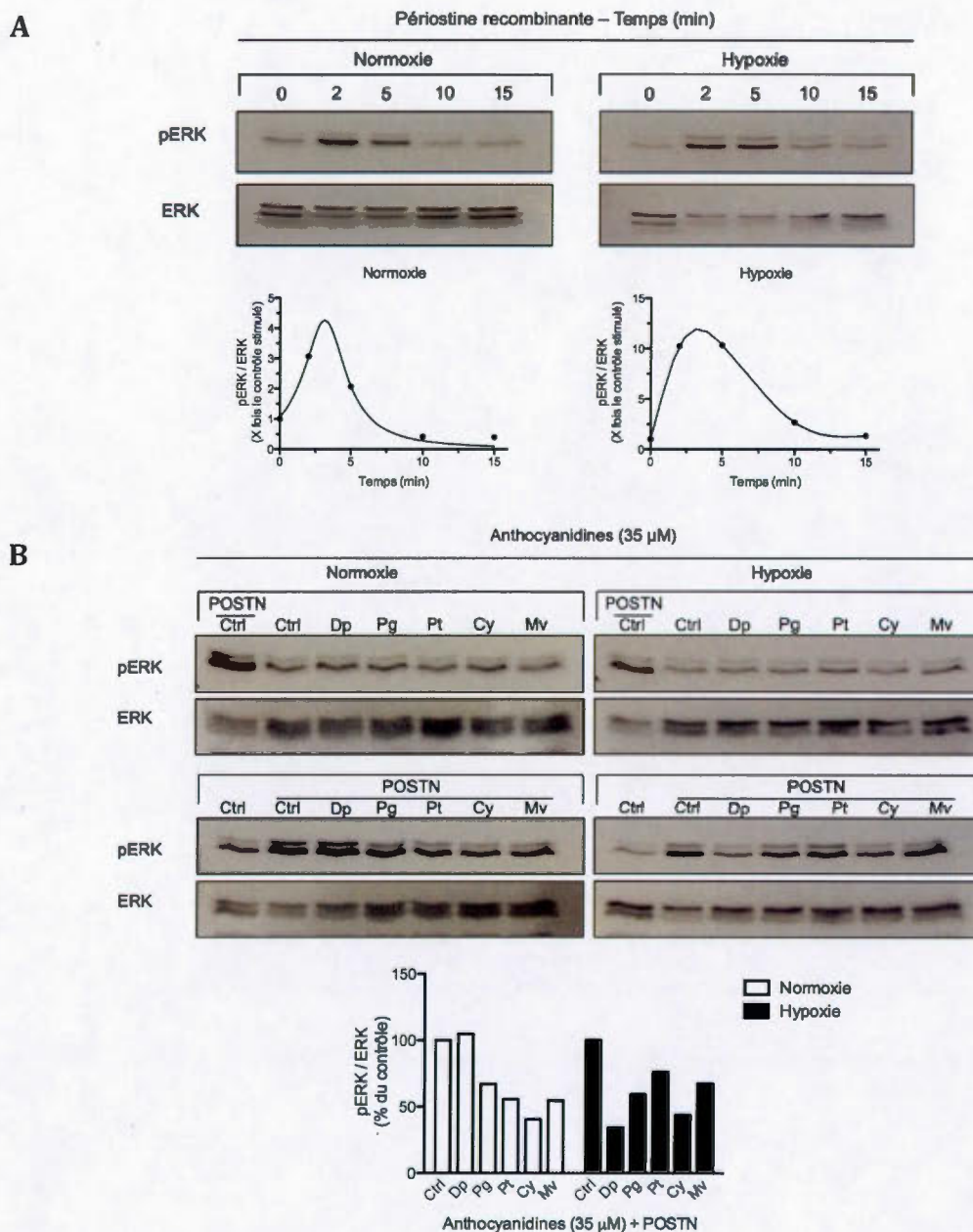


Figure 4.8: Inhibition par les anthocyanidines de l'induction de la phosphorylation de ERK1/2 dans les HBMECs. (A) Une cinétique a été effectuée dans les HBMECs avec la périostine recombinante à 100 ng/ml en normoxie ou hypoxie. **(B)** Les cellules ont été prétraitées en présence des anthocyanidines à 35 μ M pendant 48h exposées en conditions de normoxie (20% O_2) ou d'hypoxie (<2% O_2) et stimulées sans ou avec la périostine recombinante à 100 ng/ml. Les HBMECs ont été lysées et le niveau de phosphorylation a été monitoré par immunobuvardage. L'intensité des bandes a été analysée par densitométrie utilisant le programme ImageJ et exprimée en unités arbitraires. Chaque condition a été normalisée par rapport au contrôle désigné. Les immunobuvardages sont les figures représentatives.

des temps de 2 et 5 minutes. L'analyse densitométrique indique qu'en normoxie, cette phosphorylation est induite avec un facteur de trois par rapport au contrôle à un temps de 2 minutes et avec un facteur de deux à 5 minutes. On remarque également que le niveau de phosphorylation est grandement amplifié en condition d'hypoxie avec une stimulation dix fois plus élevée qu'en normoxie pour les mêmes temps.

Dans un deuxième temps, les HBMEC ont été prétraitées avec chaque anthocyanidine et stimulées avec la périostine recombinante pendant 2 minutes en conditions normoxique ou hypoxique. Comme démontré sur la Figure 4.8B, les 4 anthocyanidines pélargonidine, pétunidine, cyanidine et malvidine inhibent la phosphorylation de ERK1/2 induite par la périostine en condition de normoxie de 33, 45, 80 et 46%, respectivement. Cette diminution de la phosphorylation de ERK1/2 est également observée en condition d'hypoxie, mais en présence de toutes les anthocyanidines. La delphinidine inhibe à 66%, la pélargonidine à 41%, la pétunidine à 24%, la cyanidine à 57% et la malvidine à 33%. Étonnamment, la delphinidine n'a pas affecté la phosphorylation de ERK1/2 induite par la périostine en normoxie. Par contre, son action inhibitrice en hypoxie est beaucoup plus efficace que les autres anthocyanidines. Dans l'ensemble, l'expression basale de ERK1/2 dans les deux types de conditions ne semble pas être affectée significativement par les molécules. Pour valider ces résultats, l'expérience devra être répétée.

CHAPITRE V

DISCUSSION

Même de nos jours, les solutions thérapeutiques visant à traiter les cancers restent encore peu efficaces et ont un impact économique important. Sachant que le mode de vie joue un grand rôle sur le risque de développer un cancer, il est primordial d'envisager la prévention comme stratégie pour contrer cette maladie. En effet, la modification de nos habitudes alimentaires par une consommation riche en fruits et légumes consiste en une chimiothérapie préventive. De ce fait, la recherche met en évidence que la présence des anthocyanidines retrouvées dans l'alimentation peut prévenir différents processus pathologiques par leur activité anticancéreuse. Récemment, il a été démontré que la périostine, une protéine surexprimée dans les cellules cancéreuses, est essentielle dans l'établissement des métastases (Malanchi 2012). De plus, l'effet angiogénique de cette protéine a été démontré, elle augmente l'expression de VEGF-C et favorise la formation de tubules dans les cellules squameuses du carcinome de la tête et du cou (HNSCC) lorsque la périostine est surexprimée (Rota et al., 2012). Puisque les anthocyanidines sont reconnues, entre autres, pour leurs propriétés antiangiogéniques (Bagchi et al., 2004), ces résultats nous ont donc incités à étudier les effets des anthocyanidines ainsi que leur mécanisme d'action sur l'action proangiogénique de la périostine dont les effets sont inconnus. Nous avons effectué ces expériences dans des cellules endothéliales pour représenter un mode préventif du cancer avec les molécules naturelles. Dans le cadre de ce projet, nous avons caractérisé les effets de cinq principales anthocyanidines sur l'expression et la sécrétion de la périostine et nous avons étudié le mécanisme inhibiteur de ces molécules sur la migration et la signalisation cellulaire induites par

la périostine. Les principaux résultats de cette étude montrent que les anthocyanidines inhibent l'expression et la sécrétion de la périostine ainsi que la migration et la signalisation cellulaire induites par la périostine dans les HBMEC en normoxie et en hypoxie.

Il faut dire que l'état d'oxygénation des cellules est d'une grande importance dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques dans les tissus sains et cancéreux. Tout dépendant de leurs emplacements et leurs fonctions dans un organe, les cellules peuvent être exposées à un environnement en oxygène différent. Néanmoins, beaucoup de chercheurs vont cultiver les cellules seulement sous des conditions à 20% d'oxygène soit de normoxie, ce qui n'est malheureusement pas considéré représentatif au plan de vue physiologique. Dans ce projet, afin d'étudier l'action proangiogénique de la périostine dans les cellules endothéliales et ainsi imiter les conditions de l'angiogenèse, nous avons exposé les cellules dans une chambre hypoxique à 2% d'oxygène pour ensuite comparer avec les conditions de normoxie (20% O₂). Cette étude nous a permis d'obtenir des résultats pertinents dans la recherche au niveau physiologique.

5.1 Expression et sécrétion de la périostine dans trois lignées cellulaires endothéliales

Parmi les trois lignées cellulaires endothéliales, les HBMEC et les HMVEC expriment et sécrètent un niveau de périostine plus important comparé aux HUVEC. Aussi, les analyses d'immunobuvardage nous ont permis d'observer la présence de deux formes tronquées de la périostine dans les HBMEC et surtout dans les HMVEC. De même, Bai et al. (2010) ont identifié huit isoformes dans cinq lignées cellulaires anaplasiques de carcinome de la thyroïde.

Nous savons que l'hypoxie permet de stimuler l'angiogenèse et de recruter les cellules endothéliales au centre d'une tumeur solide pour apporter l'oxygène et les nutriments suite à la sécrétion de différents facteurs de croissance synthétisés. Les cellules sont donc soumises à un stress dû à une baisse en oxygène. Nos résultats ont démontré une sécrétion de la périostine plus forte en hypoxie qu'en normoxie et inversement sur l'expression de la périostine dans les lysats. Sachant dans la littérature que la périostine est surexprimée dans plusieurs cancers, nos résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'aussitôt que la périostine est exprimée dans les cellules soumises à l'hypoxie, elle est sécrétée dans son milieu extracellulaire comme molécule de signalisation pour interagir avec son microenvironnement et communiquer aux autres cellules qu'il y a une baisse en oxygène démontrant ainsi son action proangiogénique. Comparativement en normoxie où les cellules endothéliales sont cultivées dans des conditions optimales, la périostine est exprimée et sécrétée dans le milieu extracellulaire normalement expliquant ainsi la sécrétion de périostine plus forte en hypoxie et son expression plus forte en normoxie.

5.2 Inhibition de l'expression et de la sécrétion de la périostine par les anthocyanidines

Les anthocyanidines sont un groupe important des polyphénols et sont reconnus comme des agents chimiopréventifs du cancer. Les anthocyanidines sont retrouvées en grandes quantités dans les petits fruits. La cyanidine est la molécule la plus largement distribuée suivie de la delphinidine. Leurs bienfaits sur la santé tels que dans la prévention du cancer sont en partie attribués à leur activité antioxydante (Tsuda 2012). Notre étude a démontré pour la première fois l'effet inhibiteur des anthocyanidines sur l'expression protéique et la sécrétion de la périostine. En effet, cet effet inhibiteur sur la périostine a été démontré significativement par la Dp, Pt, Cy et Mv en normoxie et par la Dp, Cy et Mv en hypoxie dans les lysats alors qu'au

niveau de la sécrétion, seulement la Dp a eu un effet inhibiteur en normoxie et en hypoxie. Nos résultats ont démontré par cytométrie en flux que ces effets inhibiteurs ne sont pas dus à une cytotoxicité des anthocyanidines dans les HBMEC.

5.2.1 Mécanismes d'action des anthocyanidines

Il est bien documenté que les anthocyanidines ont plusieurs actions biologiques dont leur potentiel antiangiogénique, mais ceux-ci possèdent également une action antioxydante en piégeant les radicaux libres (Konczak 2004, Shih et al., 2007, Matsunaga et al., 2010). De plus, certaines études ont observé une augmentation des ROS lorsque les cellules subissent un changement en oxygène (conditions normoxique à hypoxique) (Chandel et al., 2000; Edward et al., 2007). Sachant cela, nous pouvons supposer que les faibles effets inhibiteurs des anthocyanidines observés en hypoxie dans nos essais seraient dus au fait qu'aux concentrations utilisées, les anthocyanidines agissent sur d'autres processus résultant de l'hypoxie dont sur l'augmentation des ROS. Il est possible que des concentrations plus élevées soient nécessaires pour inhiber plus efficacement l'expression et la sécrétion de la périostine en hypoxie.

Des analyses structure-fonction suggèrent que les anthocyanidines ayant une structure catéchol ont une plus grande activité antioxydante due à la stabilisation des radicaux résultants et à la formation du produit quinone stable (Ali et al., 2016). De plus, le nombre de groupements hydroxyles sur l'anneau B des anthocyanidines semble important pour l'effet inhibiteur (Lamy et al., 2005 et 2008). Par exemple, il a été rapporté que les molécules pélagonidine, péonidine et malvidine n'ayant qu'un seul groupement OH, n'ont pu inhiber la transformation des cellules induites par le TPA et l'activation par AP-1 dans les cellules JB16 (Hou et al., 2004) ni la migration des glioblastomes (Lamy et al., 2007). C'est le cas aussi dans notre étude où la

pélargonidine n'a pas d'effet inhibiteur sur l'expression de la périostine, alors que la malvidine n'a pas d'effet significatif sur son expression en hypoxie. Par contre, la pétunidine et la cyanidine ayant deux groupements hydroxyle ont démontré un effet inhibiteur sur l'expression de la périostine alors que la delphinidine, avec trois groupements hydroxyle, a clairement démontré un pouvoir inhibiteur plus puissant. Aussi, certaines études ont constaté que les substituants, dont le groupement hydroxyle et méthoxy, influencent l'énergie d'activation et de dissociation de la liaison OH du phénol (Ali et Ali, 2016; Heim et al., 2002). Ces études suggèrent que les anthocyanidines avec un groupement méthoxy possèdent une plus grande activité antioxydante que ceux avec un groupement hydroxyle.

Il est bien connu que la méthylation de l'ADN joue un rôle important dans le cancer par l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs causée par l'hyperméthylation dans la région promotrice (Kulis et al., 2010). D'ailleurs, il a été démontré que les anthocyanidines dérivés des mûres déméthylent les gènes suppresseurs de tumeurs dans les cellules cancéreuses du côlon par l'inhibition des ADN méthyltransférases DNMT1 et DNMT3B qui sont surexprimés dans plusieurs cancers (Wang et al., 2013). Quoique l'inhibition de la périostine par les anthocyanidines n'a pas été rapportée autre que par notre étude, cet effet pourrait être attribué au niveau de la transcription de la périostine par la déméthylation de l'ADN menant à la réactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. Voire, le promoteur de la périostine contient un site pour le facteur de transcription de la protéine activatrice 1 (AP-1) qui joue un rôle dans la cancérogenèse (Hixson et al., 2011). L'activité de AP-1 est stimulée par différents stimuli en activant la voie de signalisation des MAPK, dont la voie de ERK. Sachant que les anthocyanidines inhibent l'activité de AP-1 (Hou et al., 2004), ceci pourrait influencer l'expression de la périostine et donc être lié à l'inhibition de la périostine.

5.2.2 Signification physiologique des valeurs IC₅₀ obtenues

L'apport quotidien des anthocyanidines peut varier selon les cultures, les régions, les saisons et la disponibilité des aliments. La concentration dans le sang d'une source d'alimentation quotidienne en anthocyanidines peut atteindre environ 10^{-8} à 10^{-7} M (Cooke et al., 2005). Nos résultats ont démontré des inhibitions de l'expression de la périostine par les anthocyanidines de façon concentration-dépendante avec des IC₅₀ se situant entre 3,4 et 17 μ M pour la normoxie et de 4,9 et 22,5 μ M pour l'hypoxie avec la Dp, Pt, Cy et Mv (Tableau 3.1). Ces valeurs, surtout celles obtenues pour la Dp, rejoignent celles retrouvées dans le sang. En ajout, les anthocyanines sont également retrouvés dans la circulation systémique comme acides phénoliques libres ou conjugués. Comme de fait, les anthocyanines peuvent être dégradés durant la digestion gastro-intestinale et durant le métabolisme hépatique pour former plusieurs métabolites monoglucuronides (Woodward et al., 2011). Certains de ces métabolites possèdent des propriétés anticancéreuses. En effet, les acides protocatéchiques, galliques, syringiques et vanilliques, métabolites des anthocyanidines, ont des propriétés anticancéreuses dont anti-oxydantes, anti-apoptotiques et anti-prolifératives. (Hidalgo et al., 2012; Tanaka et al., 2011; Maurya et al., 2011; Volti et al., 2014; de Ferrars et al., 2014) D'ailleurs, puisque la Dp est retrouvée à 333 mg/100 g de cassis et la Cy, à 669 mg/100 g de mûres (Wu et al., 2006), nous pouvons spéculer que l'inclusion de ces fruits dans notre alimentation permettra de bénéficier de leurs effets chimiopréventifs.

5.3 Inhibition du niveau d'expression génique des intégrines par les anthocyanidines

La périostine est fortement impliquée dans l'angiogenèse et la métastase. Elle exerce ses effets via les intégrines agissant comme récepteurs. En effet, Zhou et al. 2015 ont démontré que la périostine sécrétée par les cellules souches de gliomes recrute les macrophages associés aux tumeurs par l'entremise des intégrines $\alpha_6\beta_3$. La périostine induit également l'angiogenèse par la régulation à la hausse de l'expression du récepteur VEGFR-2 en activant la voie de signalisation FAK par l'intégrine $\alpha_6\beta_3$ (Shao et al. 2004). La liaison de la périostine avec les intégrines pourrait être responsable de ses effets angiogéniques. D'ailleurs, les intégrines α_6 et β_3 sont les plus affectées au niveau génique par les cinq anthocyanidines en conditions de normoxie et ces effets sont reproduits en hypoxie. Ces résultats concordent avec une étude démontrant significativement l'inhibition de l'expression de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ par la Dp-3-g dans les plaquettes chez l'humain et la souris (Yang, et al., 2012).

5.4 Migration cellulaire induite par la périostine recombinante humaine

La périostine fournit d'importants signaux aux cellules par son interaction avec différentes molécules qui permettent une meilleure prolifération et migration des fibroblastes du derme dans la réparation des tissus (Ontsuka et al. 2012). Par conséquent, la migration cellulaire, étant une étape cruciale dans l'angiogenèse, est induite par la périostine dans les tissus cancéreux (Yan et al., 2006; Hu et al., 2015). De même, nous avons confirmé l'action proangiogénique de la périostine par une induction de la migration cellulaire dans les HBMEC. Ici, nous avons démontré pour la première fois que les anthocyanidines inhibent significativement la migration des HBMEC induite par la périostine en normoxie et en hypoxie. Puisqu'il a été démontré que la périostine recombinante favorise la sécrétion du VEGF de façon concentration-

dépendante et augmente l'expression de l'angiopoïétine-1 à des concentrations de 50 ou 100 ng/ml dans les chéloïdes (Zhang, Nie 2015), en inhibant l'action de la périostine, les anthocyanidines affecteraient également ces processus essentiels dans la réponse angiogénique (Witzenbichler 1998). Cependant, ceci reste à confirmer.

Notons que les delphinidine, malvidine et pélagonidine semblent affecter le niveau basal de la migration des HBMEC en hypoxie. Nous savons que les anthocyanidines ont plusieurs bienfaits sur la santé et affectent les cellules endothéliales de différentes façons sur d'autres fonctions biologiques et non seulement sur la périostine. Puisque c'est connu que l'hypoxie régule à la hausse le gène VEGF dans les cellules endothéliales (Liu et al., 1995) et que nous l'avons aussi démontré dans les HBMEC (Figure 4.1), et que de plus, il a été rapporté que certaines anthocyanidines des myrtilles inhibent la formation de tubules induite par le VEGF (Matsunaga et al., 2010) et que la delphinidine inhibe la phosphorylation du récepteur VEGFR-2 dans les HUVEC empêchant leur migration (Lamy et al., 2005), l'effet inhibiteur obtenu par les anthocyanidines dans nos essais pourrait en partie affecter la liaison du VEGF à son récepteur VEGFR-2.

La périostine favorise l'adhésion et la migration cellulaire par les intégrines $\alpha_3\beta_3$ et $\alpha_5\beta_5$ dans les cellules épithéliales des ovaires (Gillan et al., 2002). Nous avons confirmé et démontré pour la première fois dans les HBMEC que lorsque les cellules n'expriment plus les intégrines α_5 , α_6 , β_1 , β_3 et β_5 , il y a une diminution de la migration cellulaire induite par la périostine. Mentionnons que les cellules transfectées avec les siARN dirigées contre certaines intégrines affectent légèrement le basal ce qui est attendu puisque les intégrines jouent un rôle fondamental dans plusieurs processus biologiques.

Néanmoins, le mécanisme par lequel la périostine induit la migration via les intégrines a seulement été investigué au niveau des sous-unités α et β séparément. Il

faut mentionner que la combinaison des sous-unités α et β détermine la spécificité du ligand des intégrines. Bien qu'il a été démontré dans la littérature que la périostine transduit son signal via les intégrines dont α_5 (Gillan et al., 2002; Masuoka et al., 2012; Yan et al., 2006), celle-ci n'a étonnamment pas démontré d'effet inhibiteur. Notons qu'en absence d'une des sous-unités de l'intégrine, l'effet de l'intégrité et l'organisation du tissu par cette intégrine peut être compensé par une autre sous-unité ayant des propriétés et une spécificité de liaison au ligand similaire (Van der Flier et al., 2001). En effet, Mould et al. 2000 expliquent qu'il est possible que les sous-unités α_5 et α_6 possèdent une fonction identique dans la reconnaissance du ligand en démontrant que les sites de cation divalents, dans les séquences répétées 4 à 7 des sous-unités alpha, n'influencent pas la spécificité de liaison du ligand et que la séquence d'acides aminés Ala107-Trp226, correspondant à la deuxième et troisième séquence répétée de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, confère les mêmes propriétés de liaison du ligand que l'intégrine $\alpha_6\beta_1$. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi l'intégrine α_5 n'a pas démontré d'effet (Van de Flier et al., 2001).

De plus, la périostine se lierait à certaines intégrines par son motif YH. En effet, une étude a démontré qu'un anticorps (OC-20) bloquant la fonction du motif YH dans le domaine FAS1 empêche la liaison de la périostine aux intégrines $\alpha_5\beta_3$ et $\alpha_5\beta_5$ et que l'utilisation de cet anticorps *in vivo* inhibe l'angiogenèse et la croissance tumorale (Orecchia et al., 2011). Ainsi, dans notre étude, les anthocyanidines pourraient également agir sur ce motif. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que les intégrines α_5 , α_6 , β_1 , β_3 et β_5 sont des récepteurs potentiels de la périostine dans les HBMEC et que, ayant démontré l'inhibition du niveau d'expression génique des intégrines par les anthocyanidines, ces molécules naturelles pourraient inhiber la migration des HBMEC vers une tumeur en agissant sur les intégrines.

5.5 Signalisation cellulaire induite par la périostine recombinante humaine

La voie de signalisation ERK est parmi l'une des voies les plus étudiées dans une variété de types cellulaires. Lorsqu'elle est activée, cette voie phosphoryle différents substrats impliqués dans une multitude de réponses cellulaires incluant la prolifération, la différenciation, la survie, la motilité cellulaire et joue également un rôle central dans l'angiogenèse (Ilan et al., 1998; Pagès et al., 1993; Seger et al., 1995; Murphy et al., 2006). À l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires exacts de l'activité proangiogénique de la périostine restent encore peu connus. Selon la littérature, la périostine est capable d'activer la voie de signalisation ERK dans les lignées cellulaires de l'estomac dont OCUM-2MLN et OCUM-12 (Kikuchi et al., 2014). D'autres études ont montré que la périostine favorise l'angiogenèse et la croissance tumorale via la voie de signalisation ERK (Kikuchi et al., 2014; Zhang et al., 2015). En accord avec ces résultats, nous avons démontré la phosphorylation de ERK1/2 après 2 et 5 minutes d'incubation avec la périostine recombinante dans les HBMEC en conditions normoxique et hypoxique.

Parmi les anthocyanidines testées, la delphinidine, sous conditions hypoxiques, et la cyanidine, sous conditions normoxiques et hypoxiques, ont démontré une inhibition de plus de 50% de la phosphorylation de ERK1/2 induite par la périostine recombinante. Notons que les anthocyanidines ne semblent pas affecter le niveau basal de la phosphorylation de ERK1/2 dans les HBMEC suggérant que celles-ci interfèrent spécifiquement sur la voie de signalisation de ERK1/2 induite par la périostine.

CHAPITRE VI

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

6.1 Conclusion

Le cancer est de nos jours la maladie la plus crainte de toutes. Même si plusieurs progrès scientifiques ont été réalisés dans le traitement des cancers, certains d'entre eux ne peuvent être traités efficacement. Des études épidémiologiques affirment que les personnes ayant une alimentation saine riche en fruits et légumes réduisent leur risque de développer un cancer. Ces résultats indiquent un rôle important de la prévention afin de contrer cette terrible maladie.

En effet, les principaux résultats de notre recherche démontrent que les anthocyanidines, retrouvées en grande partie dans les petits fruits, inhibent l'expression et la sécrétion de la périostine, une protéine essentielle dans l'établissement des métastases. De plus, ces anthocyanidines inhibent la migration des HBMEC et la signalisation cellulaire de ERK1/2 induite par la périostine. Le fait que l'expression de certaines intégrines soit inhibée par les anthocyanidines pourrait également affecter la migration de ces cellules. Ces résultats ont été reproduits en conditions d'hypoxie, environnement tumoral étant considéré physiologiquement pertinent pour la recherche portant sur le développement des cancers. D'autant plus, ces expériences ont été effectuées dans un modèle de l'endothélium vasculaire cérébral soulevant l'importance des anthocyanidines comme stratégie dans la prévention des cancers cérébraux puisqu'ils sont capables de traverser la BHE, étant

un obstacle de taille dans le traitement des cancers du cerveau (Rashid et al., 2014; Youdim et al., 2003; Mohsen et al., 2006; Talavera et al., 2005). L'ensemble de ces résultats nous indique que les anthocyanidines pourraient ainsi empêcher le recrutement des cellules endothéliales au centre des tumeurs lors du processus de l'angiogenèse tumorale par l'inhibition de l'expression et de la sécrétion de la périostine par les cellules endothéliales et l'inhibition de l'action proangiogénique de la périostine.

6.2 Perspectives

Notre étude a démontré qu'en absence de l'expression des intégrines $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$ et $\beta 5$ dans les HBMEC, la migration induite par la périostine est diminuée. Afin d'approfondir notre étude, il serait intéressant d'étudier de façon plus directe l'interaction de la périostine avec ces différentes intégrines et ainsi étudier l'effet inhibiteur des anthocyanidines sur ces interactions. Les HBMEC seraient alors traitées avec la périostine recombinante en présence et en absence des anthocyanidines et mesurée en cytométrie en flux avec des anticorps spécifiques contre les intégrines. Pour confirmer l'interaction de la périostine à certaines intégrines, l'expérience serait répétée, mais avec des HBMEC transfectées avec des siARN dirigés contre les intégrines à l'étude.

De plus, sachant que la périostine induit la phosphorylation de ERK1/2, pour identifier le mécanisme moléculaire exact, la migration induite par la périostine pourrait être effectuée en présence des inhibiteurs de ERK1/2 pour confirmer son effet dans la migration. Également, l'effet des anthocyanidines sur la formation de tubes sur Matrigel induite par la périostine pourrait être exploré et ainsi vérifier si la

voie de ERK1/2 est impliquée dans ce processus en utilisant des inhibiteurs de ERK1/2.

Enfin, il serait intéressant d'aller explorer d'autres voies de signalisation dans laquelle la périostine est impliquée telles que FAK et caractériser l'effet des anthocyanidines sur celles-ci par immunobuvardage. Les intégrines pourraient aussi être bloquées avec un anticorps neutralisant afin d'identifier les voies de signalisation activées par l'interaction de la périostine via les intégrines.

BIBLIOGRAPHIE

- Ali, H.M., Almagribi, W. et Al-Rashidi, M.N. (2016). Antiradical and reductant activities of anthocyanidins and anthocyanins, structure-activity relationship and synthesis. *Food Chem*, 194, 1275-1282.
- Anand, P., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S. & Aggarwal, B.B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res*, 25(9), 2097-2116.
- Aqil, F., Vadhanam, M.V., Jeyabalan, J., Cai, J., Singh, I.P. & Gupta, R.C. (2014). Detection of anthocyanins/anthocyanidins in animal tissues. *J Agric Food Chem*, 62(18), 3912-3918.
- Auer, M., Hausott, B., & Klimaschewski, L. (2011). Rho GTPases as regulators of morphological neuroplasticity. *Ann Anat*, 193(4), 259-266.
- Bai, Y., Nakamura, M., Zhou, G., Li, Y., Liu, Z., Ozaki, T., Mori, I. & Kakudo, K. (2010). Novel isoforms of periostin expressed in the human thyroid. *Jpn Clin Med*, 1, 13-20.
- Bagchi, D. Sen, C.K. Bagchi, M. & Atalay M. (2004). Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry*, 69(1), 75-80.
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*, 16(1), 1-13.
- Bao, S., Ouyang, G., Bai, X., Huang, Z., Ma, C., Liu, M. & Wang, X.-F. (2004). Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer cell*, 5(4), 329-339.
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 401-410.

- Baril, P., Gangeswaran, R., Mahon, P.C., Caulee, K., Kocher, H.M., Harada, T. & Lemoine, N.R. (2007). Periostin promotes invasiveness and resistance of pancreatic cancer cells to hypoxia-induced cell death: role of the $\beta 4$ integrin and the PI3K pathway. *Oncogene*, 26(14), 2082-2094.
- Béliveau, R. & Gingras, D. (2005). Les aliments contre le cancer. La prévention du cancer par l'alimentation. Edition Trécarré. Montréal, Canada.
- Béliveau, R. & Gingras, D. (2014). Prévenir le cancer comment réduire les risques. Edition Trécarré. Montréal, Canada.
- Blodgett, D.M., De Zutter, J.K., Levine, K.B., Karim, P., & Carruthers, A. (2007). Structural basis of GLUT1 inhibition by cytoplasmic ATP. *J Gen Physiol*, 130(2), 157-168.
- Bouïs, D., Hospers, G.A.P., Meijer, C., Molema, G., & Mulder, N.H. (2001). Endothelium in vitro: A review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*, 4(2), 91-102.
- Cargnello, M., & Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(1), 50-83.
- Carmeliet, P., & Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nat Rev Cancer*, 407(6801), 249-257.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M.D.L., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., & Galán-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chem*, 113(4), 859-871.
- Caunt, C.J., & McArdle, C.A. (2012). ERK phosphorylation and nuclear accumulation: insights from single-cell imaging. *Biochem Soc Trans*, 40(1), 224-229.
- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., & Schumacker, P.T. (2000). Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 during hypoxia: A mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem*, 275(33), 25130-25138.

- Chang, Y., Huang, H., Hsu, J., Yang, S., & Wang, C. (2005). Anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 205(3), 201-212.
- Charalambous, C., Chen, T.C., & Hofman, F.M. (2006). Characteristics of tumor associated endothelial cells derived from glioblastoma multiforme. *Neurosurg Focus*, 20(4), 1-5.
- Charalambous, C., Hofman, F.M., & Chen, T.C. (2005). Functional and phenotypic differences between glioblastoma multiforme-derived and normal human brain endothelial cells. *J Neurosurg*, 102(4), 699-705.
- Chi, X., Wang, S., Huang, Y., Stamnes, M., & Chen, J.L. (2013). Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation. *Int J Mol Sci*, 14(4), 7089-7108.
- Clark, E. & Brugge, J. (1995). Integrins and signal transduction pathways: The road taken. *J Signal Transduct*, 268(5208), 233-239.
- Conway, S.J., Izuhara, K., Kudo, Y., Litvin, J., Markwald, R., Ouyang, G. & Kudo, A. (2014). The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci*, 71(7), 1279-1288.
- Cooke, D., Steward, W.P., Gescher, A.J., & Marczylo, T. (2005). Anthocyanins from fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *Eur J Cancer*, 41(13), 1931-1940.
- de Ferrars, R.M., Czank, C., Zhang, Q., Botting, N.P., Kroon, P.A., Cassidy, A., & Kay, C.D. (2014). The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. *Br J Pharmacol*, 171(13), 3268-3282.
- Divisi, D., Di Tommaso S., Salvemini S., Garramone, M. & Crisci, R. (2006). Diet and cancer. *Acta Biomed*, 77(2), 118-123.
- Lynn, E.G., Lu, Z., Minerbi, D. & Sack, M.N. (2007). The Regulation, control, and consequences of mitochondrial oxygen utilization and disposition in the heart and skeletal muscle during hypoxia. *Antioxid Redox Signal*, 9(9), 1353-1362.
- Erkan, M., Kleeff, J., Gorbachevski, A., Reiser, C., Mitkus, T., Esposito, I. & Friess, H. (2007). Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity. *Gastroenterology*, 132(4), 1447-1464.

- Fimognari, C., Berti, F., Nüsse, M., Cantelli-Forti, G., & Hrelia, P. (2004). Induction of apoptosis in two human leukemia cell lines as well as differentiation in human promyelocytic cells by cyanidin-3-O- β -glucopyranoside. *Biochem Pharmacol*, 67(11), 2047-2056.
- Flamini, R., Mattivi, F., Rosso, M., Arapitsas, P., & Bavaresco, L. (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes and flavonols. *Int J Mol Sci*, 14(10), 19651-19669.
- Foo, J., Leder, K., & Michor, F. (2011). Stochastic dynamics of cancer initiation. *Phys Biol*, 8(1), 015002.
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 3(5), 362-374.
- Friedl, P., & Wolf, K. (2009). Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev*, 28(1-2), 129-135.
- Ganguly, K.K., Pal, S., Moulik, S., & Chatterjee, A. (2013). Integrins and metastasis. *Cell Adh Migr*, 7(3), 251-261.
- Gillan, L., Matei, D., Fishman, D. A., Beth G., Karlan, Y. & Chang, D. D. (2002). Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for $\alpha v \beta 3$ and $\alpha v \beta 5$ integrins and promotes cell motility. *Cancer Res*, 62(18), 5358-5364.
- Goel, H.L., & Mercurio, A.M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nat Rev Cancer*, 13(12), 871-882.
- Guo, L., Dong, F., Hou, Y., Cai, W., Zhou, X., Huang, A.L., & Liu, J. (2014). Dihydroartemisinin inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by a p38 mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *Exp Ther Med*, 8(6), 1707-1712.
- Hainsworth, A.H., Oommen, A.T., & Bridges, L.R. (2015). Endothelial cells and human cerebral small vessel disease. *Brain Pathol*, 25(1), 44-50.
- Hanahan, D., & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

- Hidalgo, M., Martin-Santamaria, S., Recio, I., Sanchez-Moreno, C., de Pascual Teresa, B., Rimbach, G., & de Pascual-Teresa, S. (2012). Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites. *Genes Nutr*, 7(2), 295-306.
- Hixson, J.E., Shimmin, L.C., Montasser, M.E., Kim, D.K., Zhong, Y., Ibarguen, H., & Herrington, D. (2011). Common variants in the periostin gene influence development of atherosclerosis in young persons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(7), 1661-1667.
- Höckel, M., & Vaupel, P. (2001). Biological consequences of tumor hypoxia. *Semin Oncol*, 28(2F), 36-41.
- Huang, C., Jacobson, K., & Schaller, M.D. (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci*, 117(Pt 20), 4619-4628.
- Horiuchi, K., Amizuka, N., Takeshita, S., Takamatsu, H., Katsuura, M., Ozawa, H., & Kudo, A. (1999). Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and peridontal ligament and increased expression by transforming growth factor B. *J Bone Miner Res*, 14(7), 1239-1249.
- Hou, D.X. (2003). Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis*, 25(1), 29-36.
- Huang, C., Jacobson, K., & Schaller, M.D. (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci*, 117(Pt 20), 4619-4628.
- Hynes, R. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell Press*, 69(1), 11-25.
- Ilan, N., Mahooti, S., & Madri, J.A. (1998). Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *J Cell Sci*, 111(Pt24), 3621-3631.
- Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 307(58), 58-62.

- Jain, R.K., di Tomaso, E., Duda, D.G., Loeffler, J.S., Sorensen, A.G., & Batchelor, T.T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*, 8(8), 610-622.
- Kalluri, R., & Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6), 1420-1428.
- Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Grootaert, C., & Van Camp, J. (2015). Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal caco-2 cells—A review. *Int J Mol Sci*, 16(9), 21555-21574.
- Kang, M.-K., Lim, S.S., Lee, J.Y., Yeo, K.M., & Kang, Y.-H. (2013). Anthocyanin rich purple corn extract inhibit diabetes-associated glomerular angiogenesis. *PLoS One*, 8(11), 1-10.
- Kikuchi, Y., Kunita, A., Iwata, C., Komura, D., Nishiyama, T., Shimazu, K., & Kashima, T. G. (2014). The niche component periostin is produced by cancer-associated fibroblasts, supporting growth of gastric cancer through ERK activation. *Am J Pathol*, 184(3), 859-870.
- Kim, C.J., Sakamoto, K., Tambe, Y., & Inoue, H. (2011). Opposite regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and cell invasiveness by periostin between prostate and bladder cancer cells. *Int J Oncol*, 38(6), 1759-1766.
- Konczak I. & Zhang W. (2004). Anthocyanins—More than nature's colours. *J Biomed Biotechnol*, 2004(5), 239–240.
- Kudo, Y., Ogawa, I., Kitajima, S., Kitagawa, M., Kawai, H., Gaffney, P.M., & Takata, T. (2006). Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer. *Cancer Res*, 66(14), 6928-6935.
- Kudo, Y., Siriwardena, B.S.M.S., Hatano, H., Ogawa, I., & Takata, T. (2007). Periostin: Novel diagnostic and therapeutic target for cancer. *Histol Histopathol*, 22(10), 1167-1174.
- Kulis M, & Esteller M. (2010). DNA methylation and cancer. *Adv Genet*, 70, 27-56.
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(3), 178-196.

- Lamy, S., Blanchette, M., Michaud-Levesque, J., Lafleur, R., Durocher, Y., Moghrabi, A., & Beliveau, R. (2005). Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 phosphorylation. *Carcinogenesis*, 27(5), 989-996.
- Lamy, S., Lafleur, R., Bédard, V., Moghrabi, A., Barrette, S., Gingras, D., & Béliveau, R. (2007). Anthocyanidins inhibit migration of glioblastoma cells: Structure-activity relationship and involvement of the plasminolytic system. *J Cell Biochem*, 100(1), 100-111.
- Lamy, S., Beaulieu, E., Labbe, D., Bedard, V., Moghrabi, A., Barrette, S., Beliveau, R. (2008). Delphinidin, a dietary anthocyanidin, inhibits platelet-derived growth factor ligand/receptor (PDGF/PDGFR) signaling. *Carcinogenesis*, 29(5), 1033-1041.
- Li, J.-S., Sun, G.-W., Wei, X.-Y., & Tang, W.-H. (2007). Expression of periostin and its clinicopathological relevance in gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 13(39), 5261-5266.
- Li, W., Gao, P., Zhi, Y., Xu, W., Wu, Y., Yin, J. & Zhang, J. (2015). Periostin: its role in asthma and its potential as a diagnostic or therapeutic target. *Respir Res*, 16(57) 1-10.
- Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T. & Kourembanas, S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*, 77(3), 638-643.
- Liu, A.Y., Zheng, H., & Ouyang, G. (2014). Periostin, a multifunctional matricellular protein in inflammatory and tumor microenvironments. *Matrix Biol*, 37, 150-156.
- Lum, J.J., Bui, T., Gruber, M., Gordan, J.D., DeBerardinis, R.J., Covello, K.L., & Thompson, C.B. (2007). The transcription factor HIF-1alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes Dev*, 21(9), 1037-1049.
- Luqman, S., & Pezzuto, J. M. (2010). NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res*, 24(7), 949-963.
- Maffucci, T., Cooke, F.T., Foster, F.M., Traer, C.J., Fry, M.J., & Falasca, M. (2005). Class II phosphoinositide 3-kinase defines a novel signaling pathway in cell migration. *J Cell Biol*, 169(5), 789-799.

- Magi, S., Tashiro, E., & Imoto, M. (2012). A chemical genomic study identifying diversity in cell migration signaling in cancer cells. *Sci Rep*, 2, 823.
- Malanchi, I., Santamaria-Martinez, A., Susanto, E., Peng, H., Lehr, H.A., Delaloye, J.F., & Huelsken, J. (2012). Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*, 481(7379), 85-89.
- Matsunaga, N., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Yokota, S., & Hara, H. (2010). Inhibitory actions of bilberry anthocyanidins on angiogenesis. *Phytother Res*, 24(S1), S42-S47.
- Maurya, D.K., Nandakumar, N. & Devasagayam T.P. (2011). Anticancer property of gallic acid in A549, a human lung adenocarcinoma cell line, and possible mechanisms. *J. Clin. Biochem. Nutr*, 48(1), 85-90.
- Masuoka, M., Shiraishi, H., Ohta, S., Suzuki, S., Arima, K., Aoki, S. & Izuhara, K. (2012). Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *J Clin Invest*, 122(7), 2590-2600.
- Mayor, R., & Carmona-Fontaine, C. (2010). Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends Cell Biol*, 20(6), 319-328.
- McGhie, T.K., Ainge, G.D., Barnett, L.E., Cooney, J.M., & Jensen, D.J. (2003). Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *J Agric Food Chem*, 51(16), 4539-4548.
- McKeown, S.R. (2014). Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours implications for treatment response. *Br J Radiol*, 87(1035), 20130676.
- Michiels, C., Arnould, T., & Remade, J. (2000). Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim Biophys Acta*, 1497(1), 1-10.
- Miremedi, A., Oestergaard, M.Z., Pharoah, P.D., & Caldas, C. (2007). Cancer genetics of epigenetic genes. *Hum Mol Genet*, 16 Spec No 1, R28-49.
- Mohsen, M.A.E., Marks, J., Kuhnle, G., Moore, K., Debnam, E., Srail, S.K., Rice-Evans, C. & Spencer, J.P.E. (2006). Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats. *Br J Nutr*, 95(1), 51-58.

- Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., & Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: A critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 7(2), 150-161.
- Morra, L., & Moch, H. (2011). Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. *Virchows Arch*, 459(5), 465-475.
- Murphy, D.A., Makonnen, S., Lassoued, W., Feldman, M.D., Carter, C., & Lee, W.M.F. (2006). Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY43-9006). *Am J Pathol*, 169(5), 1875-1885.
- Nagase, H., Sasaki, K., Kito, H., Haga, A., & Sato, T. (1998). Inhibitory effect of delphinidin from *Solanum melongena* on human fibrosarcoma HT-1080 invasiveness in vitro. *Planta Medica*, 64(3), 216-219.
- Nagy, J.A., Chang, S.H., Shih, S.C., Dvorak, A.M., & Dvorak, H.F. (2010). Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost*, 36(3), 321-331.
- Nakazawa, T., Nakajima, A., Seki, N., Okawa, A., Kato, M., Moriya, H., & Yamazaki, M. (2004). Gene expression of periostin in the early stage of fracture healing detected by cDNA microarray analysis. *J Orthop Res*, 22(3), 520-525.
- Norris, R.A., Damon, B., Mironov, V., Kasyanov, V., Ramamurthi, A., Moreno Rodriguez, R., & Markwald, R. R. (2007). Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *J Cell Biochem*, 101(3), 695-711.
- Ontsuka, K., Kotobuki, Y., Shiraishi, H., Serada, S., Ohta, S., Tanemura, A., & Naka, T. (2012). Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts. *Exp Dermatol*, 21(5), 331-336.
- Orecchia, P., Conte, R., Balza, E., Castellani, P., Borsi, L., Zardi, L., & Carnemolla, B. (2011). Identification of a novel cell binding site of periostin involved in tumor growth. *Eur J Cancer*, 47(14), 2221-2229.
- Oshima, A., Tanabe, H., Yan, T., Lowe, G.N., Glackin, C.A., & Kudo, A. (2002). A novel mechanism for the regulation of osteoblast differentiation: Transcription of periostin, a member of the fasciclin I family, is regulated by the bHLH transcription factor, twist. *J Cell Biochem*, 86(4), 792-804.

- Pages, G., Lenormand P., L'allemain G., Chambard J.-C., Meloche S., & Pouyssagur J. (1993). Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci*, 90(18), 8319-8323.
- Pearson, L.L., Castle, B.E. & Kehry, M.R. (2001). CD40-mediated signaling in monocytic cells up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and kinase signaling pathways. *Int Immunol*, 13(3), 273-283.
- Persson, A.B., & Buschmann, I.R. (2011). Vascular growth in health and disease. *Front Mol Neurosci*, 4, 14.
- Qiu, Y., Hoareau-Aveilla, C., Oltean, S., Harper, S.J., & Bates, D.O. (2009). The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 6), 1207-1213.
- Radisky, E.S., & Radisky, D.C. (2010). Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15(2), 201-212.
- Rashid, K., Wachira, F.N., Nyabuga, J.N., Wanyonyi, B., Murilla, G., & Isaac, A. O. (2014). Kenyan purple tea anthocyanins ability to cross the blood brain barrier and reinforce brain antioxidant capacity in mice. *Nutr Neurosci*, 17(4), 178-185.
- Rota, R., Kudo, Y., Iizuka, S., Yoshida, M., Nguyen, P.T., Siriwardena, S.B.S.M., & Takata, T. (2012). Periostin directly and indirectly promotes tumor lymphangiogenesis of head and neck cancer. *PLoS One*, 7(8), e44488.
- Rui, Hai, & Liu. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *J Nutr*, 134(12S), 3479S-3485S.
- Ruan, K., Bao, S., & Ouyang, G. (2009). The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci*, 66(14), 2219-2230.
- Sasaki, H., Auclair, D., Kaji, M., Fukai, I., Kiriya, M., Yamakawa, Y., & Chen, L.B. (2001). Serum level of the periostin, a homologue of an insect cell adhesion molecule, in thymoma patients. *Cancer lett*, 172(1), 37-42.
- Shao, R., Bao, S., Bai, X., Blanchette, C., Anderson, R.M., Dang, T., & Wang, X. F. (2004). Acquired expression of periostin by human breast cancers promotes tumor angiogenesis through up-regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression. *Mol Cell Biol*, 24(9), 3992-4003.

- Seger, R., & Krebs, E. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 9(9), 726-735.
- Shih, P.-H., Yeh, C.T., & Gow-Chin, Y. (2007). Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *Agric Food Chem*, 55(23), 9427-9435.
- Siriwardena, B.S., Kudo, Y., Ogawa, I., Kitagawa, M., Kitajima, S., Hatano, H., & Takata, T. (2006). Periostin is frequently overexpressed and enhances invasion and angiogenesis in oral cancer. *Br J Cancer*, 95(10), 1396-1403.
- Société Canadienne du Cancer. Rapport récupéré le 6/01/2016. <http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/Canadian-Cancer-Statistics-2015-FR.pdf?la=fr-CA>
- Strese, S., Fryknäs, M., Larsson, R., & Gullbo, J. (2013). Effects of hypoxia on human cancer cell line chemosensitivity. *BMC Cancer*, 13(1), 331.
- Sumpio, B.E., Riley, J.T., & Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(12), 1508-1512.
- Sun, Y., Liu, W.-Z., Liu, T., Feng, X., Yang, N., & Zhou, H.-F. (2015). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct*, 35(6), 600-604.
- Surh, Y.-J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3(10), 768-780.
- Tahanian, E., Sanchez, L.A., Shiao, T.C., Roy, R. et Annabi, B. (2011). Flavonoids targeting of IkappaB phosphorylation abrogates carcinogen-induced MMP-9 and COX-2 expression in human brain endothelial cells. *Drug Des Devel Ther*, 5, 299-309.
- Tai, I.T., Dai, M., & Chen, L.B. (2005). Periostin induction in tumor cell line explants and inhibition of in vitro cell growth by anti-periostin antibodies. *Carcinogenesis*, 26(5), 908-915.
- Takagi, H., King, G.L. & Aiello L.P. (1998). Hypoxia upregulates glucose transport activity through an adenosine-mediated increase of GLUT1 expression in retinal capillary endothelial cells. *Diabetes*, 47(9), 1480-1488.

- Takayama, G., Arima, K., Kanaji, T., Toda, S., Tanaka, H., Shoji, S., & Izuhara, K. (2006). Periostin: A novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol*, 118(1), 98-104.
- Talavera, S.V., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Gil-Izquierdo, C., Lamaison, J.O.L., & Reameasy, C. (2005). Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J Agric Food Chem*, 53(10), 3902-3908.
- Talmadge, J.E., & Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*, 70(14), 5649-5669.
- Tanaka, T., Tanaka, T., & Tanaka, M. (2011). Potential cancer chemopreventive activity of protocatechuic acid. *J Exp Clin Med*, 3(1), 27-33.
- Tilman, G., Mattiussi, M., Brasseur, F., van Baren, N., & Decottignies, A. (2007). Human periostin gene expression in normal tissues, tumors and melanoma: evidences for periostin production by both stromal and melanoma cells. *Mol Cancer*, 6, 80.
- Tsuda, T. (2012). Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Mol Nutr Food Res*, 56(1), 159-170.
- Valastyan, S., & Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), 275-292.
- Vallon, M., Chang, J., Zhang, H., & Kuo, C.J. (2014). Developmental and pathological angiogenesis in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*, 71(18), 3489-3506.
- Van der Flier, A., & Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, 305(3), 285-298.
- Volti, G.L., Spilioti, E., Jaakkola, M., Tolonen, T., Lipponen, M., Virtanen, V., & Moutsatsou, P. (2014). Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece. *PLoS One*, 9(4) e94860.
- Wallace, T.A., Martin, D.N., & Ambs, S. (2011). Interactions among genes, tumor biology and the environment in cancer health disparities: examining the evidence on a national and global scale. *Carcinogenesis*, 32(8), 1107-1121.

- Walsh, J.C., Lebedev, A., Aten, E., Madsen, K., Marciano, L., & Kolb, H.C. (2014). The clinical importance of assessing tumor hypoxia: relationship of tumor hypoxia to prognosis and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 21(10), 1516-1554.
- Wang, L.-S., & Stoner, G. D. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer lett*, 269(2), 281-290.
- Wang, L.-S., Kuo, C.-T., Cho, S.-J., Seguin, C., Siddiqui, J., Stoner, K., & Huang, Y.-W. (2013). Black Raspberry-Derived Anthocyanins demethylate tumor suppressor genes through the inhibition of DNMT1 and DNMT3B in colon cancer cells. *Nutr Cancer*, 65(1), 118-125.
- Welf, E.S., & Haugh, J. M. (2011). Signaling pathways that control cell migration: models and analysis. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 3(2), 231-240.
- Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S., & Carmeliet, P. (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest*, 123(8), 3190-3200.
- Wiesmann, H., Liang, Y., Fantl, W.J., & Williams, L.T. (2000). Regulation of Cyclooxygenase-2 and periostin by Wnt-3 in mouse mammary epithelial cells. *J Biol Chem*, 275(41), 32046–32051.
- Witzenbichler, B., Maisonpierre, P.C., Jones, P., Yancopoulos, G.D., & Isner, J.M. (1998). Chemotactic Properties of Angiopoietin-1 and -2, Ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem*, 273(29), 18514-18521.
- Woodward, G.M., Needs, P.W. et Kay, C.D. (2011). Anthocyanin-derived phenolic acids form glucuronides following simulated gastrointestinal digestion and microsomal glucuronidation. *Mol Nutr Food Res*, 55(3), 378-386.
- World cancer research fund / American institute for cancer research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: AICR, (2007). Récupéré le 10/01/2016. http://www.aicr.org/assets/docs/pdf/reports/Second_Expert_Report.pdf
- Wu, Y., Beecher, G., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., & Prior, R.L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States

- and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem*, 54(11), 4069-4075.
- Yamaguchi, H., & Condeelis, J. (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta*, 1773(5), 642-652.
- Yan, W., & Shao, R. (2006). Transduction of a mesenchyme-specific gene periostin into 293T cells induces cell invasive activity through epithelial-mesenchymal transformation. *J Biol Chem*, 281(28), 19700-19708.
- Yang, Y., Shi, Z., Rehemian, A., Jin, J.W., & Li, C. (2012). Plant food delphinidin-3 glucoside significantly inhibits platelet activation and thrombosis: Novel protective roles against cardiovascular diseases. *PLoS One* 7(5), 1-12.
- Yang, Y., Sun, M., Wang, L., & Jiao, B. (2013). HIFs, angiogenesis, and cancer. *J Cell Biochem*, 114(5), 967-974.
- Youdim, K.A., Dobbie, M.S., Kuhnle, G., Proteggente, A.R., Abbott, N.J. & Rice-Evans, C. (2003), Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: *in vitro* studies. *J Neurochem*, 85(1): 180-192.
- Zhang, Y., Vareed, S.K., & Nair, M.G. (2005). Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci*, 76(13), 1465-1472.
- Zhang, Z., Nie, F., Chen, X., Qin, Z., Kang, C., Chen, B., Ma, J., Pan, B., & Ma, Y. (2013). Upregulated periostin promotes angiogenesis in keloids through activation of the ERK 1/2 and focal adhesion kinases pathways, as well as the upregulated expression of VEGF and angiopoietin-1. *Mol Med Rep*, 11(2), 857-864.
- Zheng, J. (2012). Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). *Oncol Lett*, 4(6), 1151-1157.
- Zhou, W., Ke, S.Q., Huang, Z., Flavahan, W., Fang X., Paul J., Wu L., Sloan, A.E., McLendon, R.E., Li, X., Rich, J.N. & Bao, S. (2015). Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol*, 17(2), 1-10.